

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/022086 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 1/00, 3/00, 5/38, 25/00, 29/00, 35/00, G01N 33/15, 33/50
- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市 淀川区 十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011160
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 1 日 (01.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-256522 2002 年 9 月 2 日 (02.09.2002) JP  
特願2003-55104 2003 年 3 月 3 日 (03.03.2003) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福住 昌司 (FUKUSUMI, Shoji) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つくば市 並木 3 丁目 1 7-6-3 0 2 Ibaraki (JP). 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7-9-1 4 0 2 Ibaraki (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ADRENOCORTICAL HORMONE SECRETION CONTROLLER

(54) 発明の名称: 副腎皮質ホルモン分泌調節剤

(57) Abstract: Because of having an effect of controlling adrenocortical hormone secretion, a secretory protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, its peptide fragment or a salt thereof is useful as an adrenocortical hormone secretion controller.

(57) 要約: 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩は副腎皮質分泌調節作用を有しており、副腎皮質ホルモン分泌調節剤として有用である。

WO 2004/022086 A1

## 明 細 書

## 副腎皮質ホルモン分泌調節剤

## 5 技術分野

本発明は、A Q 2 7 受容体に結合しうる新規な分泌蛋白質またはそれをコードするポリヌクレオチドを含有する副腎皮質ホルモン分泌調節剤などに関する。

## 10 背景技術

近年、ヒトゲノムDNAあるいは各種ヒト組織由来のcDNAのランダムな配列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知の蛋白質をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。

## 15 オーフアンG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるA Q 2 7 受容体およびそのDNAが報告されている (WO 0 1 / 1 6 3 1 3 号) 。

本発明は、A Q 2 7 受容体およびそれに結合しうる新規な分泌蛋白質の新規な用途、すなわち副腎皮質ホルモン分泌調節剤などとしての用途を提供する。

20

## 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト全脳等から分泌シグナルを含む新規なペプチドをコードする4種類のDNAを取得することに成功し、このDNAに分泌ペプチドがコードされていることを見出した。さらに、本発明者らは、これらの分泌ペプチドが予想外にもA Q 2 7 受容体に結合すること、副腎皮質ホルモン分泌促進作用を示すことを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

25

すなわち、本発明は、

〔1〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔2〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列である第〔1〕記載の剤、

〔3〕部分ペプチドが、

（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

（2）配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

（3）配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、  
または

（4）配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである第〔1〕記載の剤、

〔4〕部分ペプチドが、

（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目または第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、

（2）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のグルタミン残基（G1n）がピログル

タミン化されているペプチド、または

(3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のアルギニン残基 (A r g) がチロシン残基 (T y r) に置換されているペプチドである第〔1〕記載の剤、

5   〔5〕副腎皮質ホルモン分泌促進剤である第〔1〕記載の剤、

〔6〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔5〕記載の剤、

10   〔7〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔8〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列である第〔7〕記載の剤、

15   〔9〕部分ペプチドが、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

20   (2) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、

(3) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、または

25   (4) 配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである第〔7〕記載の剤、

〔10〕部分ペプチドが

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～133番



目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目または第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、

- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のグルタミン残基 (G l n) がピログルタミン化されているペプチド、または
- 10 (3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のアルギニン残基 (A r g) がチロシン残基 (T y r) に置換されているペプチドである第〔7〕記載の剤、

- 〔11〕副腎皮質ホルモン分泌促進剤である第〔7〕記載の剤、
- 〔12〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔11〕記載の剤、

- 〔13〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤、

- 25 〔14〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

- 〔15〕副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である第〔14〕記載の剤、

〔16〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である  
5 第〔15〕記載の剤、

〔17〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副  
10 腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤、

15 〔18〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔19〕副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である第〔18〕記載の剤、

20 〔20〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である  
第〔19〕記載の剤、

25 〔21〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥

満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤、

- 5   〔22〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

- 10   〔23〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤、

- 15   〔24〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔23〕記載の剤、

〔25〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤、

- 20   〔26〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔25〕記載の剤、

- 25   〔27〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔28〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一

のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤、

- 5   〔29〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔28〕記載の剤、

- 10   〔30〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤、

- 15   〔31〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔30〕記載の剤、

- 20   〔32〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

- 20   〔33〕副腎皮質ホルモン分泌促進剤である第〔32〕記載の剤、

〔34〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔33〕記載の剤、

- 25   〔35〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔36〕副腎皮質ホルモン分泌促進剤である第〔35〕記載の剤、

〔37〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮

質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔36〕記載の剤、

〔38〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤、

〔39〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔40〕副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である第〔39〕記載の剤、

〔41〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔40〕記載の剤、

〔42〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症

候群の診断剤、

〔４３〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔４４〕副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である第〔４３〕記載の剤、

〔４５〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、ＣＲＨ産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔４４〕記載の剤、

〔４６〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、ＣＲＨ産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤、

〔４７〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

〔４８〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩を

含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤、

〔４９〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔４８〕記載の剤、

- ５   〔５０〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤、

- １０   〔５１〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、ＣＲＨ産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔５０〕記載の剤、

- １５   〔５２〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

- ２０   〔５３〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤、

〔５４〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔５３〕記載の剤、

- ２５   〔５５〕配列番号：９、配列番号：１１または配列番号：１３で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するＡＱ２７受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤、

〔５６〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体

腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔55〕記載の剤、

- 5     〔57〕（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と（2）配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩との
- 10    結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤、

- 〔58〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対するアゴニストを含有してなる副腎
- 15    皮質ホルモン分泌促進剤、

      〔59〕低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である第〔58〕記載の剤、

- 〔60〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる
- 20    副腎皮質ホルモン分泌阻害剤、

- 〔61〕クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性
- 25    コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である第〔60〕記載の剤、

      〔62〕哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチ



- ド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストの有効量を投与することを特徴とする (i) 副腎皮質ホルモン分泌促進方法または (ii) 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療方法、
- 〔63〕哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストの有効量を投与することを特徴とする (i) 副腎皮質ホルモン分泌促進方法または (ii) 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療方法、

有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、

③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはその

5 エステルまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩

10 に対する抗体、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、⑦

15 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体、その部分

20 ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体またはその塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする（i）副腎皮質ホルモン分泌阻害方法または（ii）クッシング病、クッシング症候群、副腎

25 皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療方法、

〔64〕（i）副腎皮質ホルモン分泌促進剤または（ii）低アルドステロン症、

低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤を製造するための、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストの使用、

[65] (i) 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤または (ii) クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性

副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤を製造するための、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアンタゴニストの使用、

[66] 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一

- のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および（または）配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする副腎皮質ホルモン分泌調節薬のスクリーニング方法、
- 5     〔67〕配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および（または）配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
- 10    のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする副腎皮質ホルモン分泌調節薬のスクリーニング用キット、
- 〔68〕試験化合物を非哺乳動物に投与し、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を測定することを特徴とする配列番号：9、配列番号：11
- 15    または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および
- 〔69〕配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受
- 20    容体またはその塩を活性化する化合物またはその塩を非ヒト哺乳動物に投与した場合と、該AQ27受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を非ヒト哺乳動物に投与した場合における、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を測定し、比較することを特徴とする該AQ27受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。
- 25    さらに、本発明は、
- 〔70〕（i）配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、

- その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を接触させた場合と (ii) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に、配列番号：1で表わされるア
- 5 ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および試験化合物を接触させた場合における、副腎皮質ホルモン分泌促進活性または男性ホルモン分泌促進活性を測定し、比較することを特徴とする配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する
- 10 分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- [71] (i) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わさ
- 15 れるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩を活性化する化合物を、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体を含有する細胞に接触させた場合と (ii) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるア
- 20 ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体を含有する細胞に接触させた場合における、副腎皮質ホルモン分泌促進活性または男性ホルモン分泌
- 25 促進活性を測定し、比較することを特徴とする配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその

塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

- [72] 試験化合物（例、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号：9、配列番号：1
- 5 1または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の結合性を変化させる化合物またはその塩）を、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体を含有する細胞に接触させた場合
- 10 における、副腎皮質ホルモン分泌促進活性または男性ホルモン分泌促進活性を測定することを特徴とする配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- 15 [73] (i) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩を活性化する化合物またはその塩（例、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）を配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされる
- 20 アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩を活性化
- 25 化する化合物またはその塩（例、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩）および試験化合物（例、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエ

- ステルまたはその塩と配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩の結合性を変化させる化合物またはその塩）をAQ 2 7受容体を含有する細胞に接触させた場合における、
- 5 副腎皮質ホルモン分泌促進活性または男性ホルモン分泌促進活性を測定し、比較することを特徴とする配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、
- 10 [ 7 4 ] 試験化合物（例、配列番号： 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩
- 15 の結合性を変化させる化合物またはその塩）を非哺乳動物に投与し、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を測定することを特徴とする配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および
- 20 [ 7 5 ] ( i ) 配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体またはその塩を活性化する化合物またはその塩（例、配列番号： 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたは
- 25 その塩）を非ヒト哺乳動物に投与した場合と、 ( ii ) 配列番号： 9、配列番号： 1 1または配列番号： 1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ 2 7受容体またはその塩を活性化する化合物またはその塩（例、配列番号： 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、その



- アミドもしくはそのエステルまたはその塩) および試験化合物を非ヒト哺乳動物に投与した場合における、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を測定し、比較することを特徴とする配列番号: 9、配列番号: 11または配列番号: 13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 図1はヒト型分泌蛋白質のDNA配列を示す。
- 10 図2はヒト型分泌蛋白質のアミノ酸配列を示す。
- 図3はラット型分泌蛋白質のDNA配列を示す。
- 図4はラット型分泌蛋白質のアミノ酸配列を示す。
- 図5はヒト型分泌蛋白質とラット型分泌蛋白質のアミノ酸配列の比較図を示す。
- 図6は新規ヒト型ペプチド: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1
- 15 の第127番目~133番目) および新規ヒト型ペプチド:  
Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第80番目~88番目) のヒトAQ27受容体およびヒトOT7T022受容体を発現させていないHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性 (cps) を示す。横軸はペ
- 20 プチドの濃度 (μM) を示す。FSKはフォルスコリンを示す。EHAGCRFRF-NH<sub>2</sub>はペプチド Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第80番目~88番目) を、GGFSFRFはペプチド  
Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第127番目~133番目) を示す。baseはペプチド無添加の場合を示す。
- 25 図7は新規ヒト型ペプチド: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第127番目~133番目) および新規ヒト型ペプチド:  
Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第80番目~88番目) のヒトAQ27受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸はル

- シフェラーゼ活性 (c p s) を示す。横軸はペプチドの濃度 ( $\mu$ M) を示す。FSKはフォルスコリンを示す。EHAGCRFRF-NH<sub>2</sub>はペプチド Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第80番目~88番目) を、GGFSFRFはペプチド Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第127番目~133番目) を示す。baseはペプチド無添加の場合を示す。
- 図8はマウス型分泌蛋白質のDNA配列を示す。
- 図9はマウス型分泌蛋白質のアミノ酸配列を示す。
- 図10は新規ヒト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目~133番目) のヒトAQ27受容体を発現させていないHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性 (c p s) を示す。横軸はペプチドの濃度 ( $\mu$ M) を示す。FSKはフォルスコリンを示す。RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>はペプチド Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目~133番目) を示す。baseはペプチド無添加の場合を示す。
- 図11は新規ヒト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目~133番目) のヒトAQ27受容体を発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性 (c p s) を示す。横軸はペプチドの濃度 ( $\mu$ M) を示す。FSKはフォルスコリンを示す。RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>はペプチド Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目~133番目) を示す。baseはペプチド無添加の場合を示す。
- 図12はAQ27発現CHO細胞におけるcAMP産生抑制活性を示す。n=2の平均値である。縦軸はcAMP濃度 (pmol) を示す。横軸はペプチドの濃度をlogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>はヒト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1

の第124番目～133番目)を示す。

図13はmock CHO細胞におけるcAMP産生抑制活性を示す。n=2の  
 平均値を示す。縦軸はcAMP濃度(pmol)を示す。横軸はペプチドの濃度を1  
 5 0 μMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FS  
 K+はフォルスコリン添加の場合を示す。RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>はヒト型  
 ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第  
 124番目～133番目)を示す。

図14はGGFSFRF-NH<sub>2</sub>のAQ27発現CHO細胞における細胞内カルシ  
 ウムイオン遊離促進活性を示す。縦軸のFluorescenceは蛍光強度  
 10 (cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。GGFSFRF-NH<sub>2</sub>はヒト型ペプチド:  
 Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第127番目～133番目)  
 を示す。○、□および▲はそれぞれ添加したGGFSFRF-NH<sub>2</sub>の濃度が0 μM、  
 1 μMおよび10 μMであることを示す。

図15はRKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>のAQ27発現CHO細胞における細胞内  
 15 カルシウムイオン遊離促進活性を示す。縦軸のFluorescenceは蛍  
 光強度(cps)を示す。横軸は時間(秒)を示す。RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>はヒ  
 ト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1  
 の第124番目～133番目)を示す。○、□および▲はそれぞれ添加したG  
 GFSFRF-NH<sub>2</sub>の濃度が0 μM、1 μMおよび10 μMであることを示す。

20 図16は新規ヒト型ペプチド:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg  
 -Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>、

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Th  
 r-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg

25 -Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第108番目～1  
 33番目および第91番目～133番目)のヒトAQ27受容体を発現させて  
 いないHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性(ルシフ  
 ェラーゼ活性)を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性(cps)を示す。横軸は  
 ペプチドの濃度を10 μMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無

添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。T1-F26-NH<sub>2</sub>は新規ヒト型ペプチド：

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：1の第108番目～13

5 3番目）、Pyr1-F43-NH<sub>2</sub>は新規ヒト型ペプチド：Pyr

-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：1の第91番目～133番目）を示す。Pyrは環状ピログルタミル化されたグルタミンを示す。

10 図17は新規ヒト型ペプチド：

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>、

Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg

15 -Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：1の第108番目～133番目および第91番目～133番目）のヒトAQ27受容体を発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性（ルシフェラーゼ活性）を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性（cps）を示す。横軸はペプチドの濃度をlogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。T1-F26-NH<sub>2</sub>は新規ヒト型ペプチド：

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：1の第108番目～133番目、Pyr1-F43-NH<sub>2</sub>は新規ヒト型ペプチド：

25 Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：1の第91番目～133番目）を示す。Pyrは環状ピログルタミル化されたグルタミンを示す。

図18は新規ヒト型ペプチドPyr1-F43-NH<sub>2</sub>によるAQ27発現C

HO細胞での細胞内カルシウムイオン動員活性を示す。縦軸の *Fluorescence* は蛍光強度 (cps) を示す。横軸は時間 (秒) を示す。□はペプチド無添加の場合を、■、△、▲、○、●および◇は添加したペプチドの濃度を  $10^{-6}$  M で表したものであり、それぞれ 5、6、7、8、9 および 10 を示す。

- 5 図 19 は mock CHO 細胞での細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する新規ヒト型ペプチド: Pyr1-F43-NH<sub>2</sub> の影響を調べた結果を示す。縦軸の *Fluorescence* は蛍光強度 (cps) を示す。横軸は時間 (秒) を示す。□はペプチド無添加の場合を、■、△、▲、○、●および◇は添加したペプチドの濃度を  $10^{-6}$  M で表したものであり、それぞれ 5、6、7、8、9 および 10 を示す。

図 20 は新規ヒト型ペプチド Pyr1-F43-NH<sub>2</sub> による AQ27 発現 CHO 細胞での cAMP 産生抑制活性を示す。n=3 の平均値。縦軸の *inhibition* は cAMP 産生抑制率 (%) を示す。横軸の *Conc.* は添加したペプチドの濃度を  $10^{-6}$  M で表した。

- 15 図 21 は mock CHO の cAMP 産生抑制活性に対する新規ヒト型ペプチド Pyr1-F43-NH<sub>2</sub> の影響を調べた結果を示す。n=3 の平均値。縦軸の *inhibition* は cAMP 産生抑制率 (%) を示す。横軸の *Conc.* は添加したペプチドの濃度を  $10^{-6}$  M で表した。

図 22 は新規ヒト型ペプチド:

- 20 Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 61 番目~86 番目) のヒト AQ27 受容体を発現させていない HEK293 細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸はルシフェラーゼ活性 (cps)、横軸はペプチドの濃度を  $10^{-6}$  M で表したものである。FSK- はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+ はフォルスコリン添加の場合を示す。A1-F28-NH<sub>2</sub> は新規ヒト型ペプチド:

- 25 Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 61 番目~86 番目) を示す。

図23は新規ヒト型ペプチド：

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号：1の第61番目～86番目) のヒトAQ27受容体を発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性 (ルシフェラーゼ活性) を示す。縦軸のFluorescenceはルシフェラーゼ活性 (cps)、横軸はペプチドの濃度をlogMで表したものである。FSK-はフォルスコリン無添加の場合を、FSK+はフォルスコリン添加の場合を示す。A1-F28-NH<sub>2</sub>は新規ヒト型ペプチド：

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号：1の第61番目～86番目) を示す。

図24は新規ヒト型ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>によるAQ27発現CHO細胞での細胞内カルシウムイオン動員活性を示す。縦軸のFluorescenceは蛍光強度 (cps) を示す。横軸は時間 (秒) を示す。\*はペプチド無添加の場合を、■、●、○、▲、◇および◆はペプチドの濃度をlogMで表したものであり、それぞれ5、6、7、8、9および10を示す。

図25はmock CHO細胞での細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する新規ヒト型ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>の影響を調べた結果を示す。縦軸のFluorescenceは蛍光強度 (cps) を示す。横軸は時間 (秒) を示す。\*はペプチド無添加の場合を、■、●、○、▲、◇および◆はペプチドの濃度をlogMで表したものであり、それぞれ5、6、7、8、9および10を示す。

図26は新規ヒト型ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>によるAQ27発現CHO細胞でのcAMP産生抑制活性を示す。n=2の平均値。縦軸のinhibitionはcAMP産生抑制率 (%) を示す。横軸のConc. は添加したペプチドの濃度をlogMで表したものである。

図27はmock CHO細胞のcAMP産生抑制活性に対する新規ヒト型ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>の影響を調べた結果を示す。n=2の平均値。縦軸

- の *inhibition* は cAMP 産生抑制率 (%) を示す。横軸の *Conc.* は添加したペプチドの濃度を  $\log M$  で表したものである。
- 図 28 はウシ型分泌蛋白質の DNA 配列を示す。
- 図 29 はウシ型分泌蛋白質のアミノ酸配列を示す。
- 5 図 30 はラット AQ27 受容体の塩基配列を示す。
- 図 31 はラット AQ27 受容体のアミノ酸配列を示す。
- 図 32 はマウス AQ27 受容体の塩基配列を示す。
- 図 33 はマウス AQ27 受容体のアミノ酸配列を示す。
- 図 34 はヒト AQ27 受容体 (A)、ラット AQ27 受容体 (B) およびマウス AQ27 受容体 (C) のアミノ酸配列の相同性を示す。
- 10 図 35 は AQ27 受容体 mRNA のヒトにおける組織分布を示す。
- 図 36 は AQ27 受容体 mRNA のラットにおける組織分布を示す。図中の *i* は *infant* (胎児) を示す。
- 図 37 はラット型分泌蛋白質の mRNA のラットにおける組織分布を示す。
- 15 図 38 はヒト型分泌蛋白質の mRNA のヒトにおける組織分布を示す。
- 図 39 は *in situ* ハイブリダイゼーション法による AQ27 mRNA のラット脳における発現分布を示す。シグナルの相対強度の +++ は最も強い (*highest*)、++ は中程度 (*moderate density*)、+ は弱い (*low density*) を示す。
- 20 図 40 はヒト型分泌蛋白質遺伝子を導入した CHO 細胞またはヒト型分泌蛋白質遺伝子を導入していない CHO 細胞の細胞上清を AQ27 受容体発現細胞 (AQ27/HEK) または AQ27 受容体を発現していない細胞 (pAKKO/HEK) に接触させた時の特異的刺激活性を検出した結果を示す。縦軸はルシフェラーゼの発現量 (cps) を示す。横軸は AQ27 受容体に反応させた物質の濃度または希釈度を示す。Basal は無添加の場合を示す。FSK はフォルスコリンを添加した場合を示す。ペプチド (1) はヒト型ペプチド: Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 80 番目 ~ 88 番目) を、ペプチド (2) はヒト型ペプチド: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 127 番目 ~ 133 番目) を添加した場合を示す。moc
- 25

k SUP. はヒト型分泌蛋白質遺伝子を導入していないCHO細胞の細胞上清を添加した場合を示す。ペプチドF SUP. はヒト型分泌蛋白質遺伝子を導入したCHO細胞の細胞上清を添加した場合を示す。

図41は既知の抗RFRP-1抗体 1F3-1とヒト型分泌蛋白質との反応曲線を示す。縦軸の $B/B_0$  (%) はサンプル添加時の結合量とサンプル非添加時の結合量の比を、横軸のPeptide conc. はヒト型分泌蛋白質の濃度をlogMで表したものである。

図42は既知の抗RFRP-1抗体 1F3-1を用いたアフィニティクロマトグラフィー結合画分のAQ27受容体発現細胞 (AQ27) またはAQ27受容体を発現していない細胞 (pAKKO) に対する特異的刺激活性を示す。横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性 (cps) を示す。横軸はアフィニティクロマトグラフィー結合画分の番号を示す。

図43は図42のフラクション20 (fr. 20) を分離した時の各フラクションのAQ27受容体発現細胞に対する特異的刺激活性を示す。横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性 (cps) を示す。横軸はフラクションの番号を示す。3と4は活性ピークを示す。

図44は図42のフラクション20-13 (fr. 20-23) を分離した時の各フラクションのAQ27受容体発現細胞に対する特異的刺激活性を示す。横軸のLuciferase activityはルシフェラーゼ活性 (cps) を示す。横軸はフラクションの番号を示す。1と2は活性ピークを示す。

図45は図43および図44の活性ピーク1~4に含まれるヒト型ペプチドの測定分子量と理論値およびアミノ酸配列を示す。

図46は長さの異なるヒト型ペプチドのアミノ酸配列と各種ヒト型ペプチドのAQ27発現CHO細胞株に対するcAMP産生抑制活性 ( $EC_{50}$  値) を示す。

図47は図46に示したヒト型ペプチドのAQ27発現CHO細胞株に対するcAMP産生抑制率を示す。縦軸のinhibition (%) はcAMP産生抑制率 (%) を示す。横軸のConcentration (logM) は添加したヒト型ペプチドの濃度をlogMで表したものである。

図48は図46に示したヒト型ペプチドのコルチコステロン (cortico



sterone) の分泌刺激活性を調べた結果を示す。縦軸の concentration は血中コルチコステロンの濃度 (ng/mi) を示す。横軸の Pre はヒト型ペプチドの投与前を、10min は投与後10分を、30min は投与後30分を示し、左の白カラムは生理食塩水を投与した場合 (Control)、右の黒カラムはヒト型ペプチドを投与した場合 (AQ27L) を示す。

図49は図46に示したヒト型ペプチドのテストステロン (Testosterone) の分泌刺激活性を調べた結果を示す。縦軸の concentration は血中テストステロンの濃度 (ng/mi) を示す。横軸の Pre はヒト型ペプチドの投与前を、10min は投与後10分を、30min は投与後30分を示し、左の白カラムは生理食塩水を投与した場合 (Control)、右の黒カラムはヒト型ペプチドを投与した場合 (AQ27L) を示す。

図50は図46に示したヒト型ペプチドのアルドステロン (Aldosterone) の分泌刺激活性を調べた結果を示す。縦軸の concentration は血中アルドステロンの濃度 (ng/mi) を示す。横軸の Pre はヒト型ペプチドの投与前を、10min は投与後10分を、30min は投与後30分を示し、左の白カラムは生理食塩水を投与した場合 (Control)、右の黒カラムはヒト型ペプチドを投与した場合 (AQ27L) を示す。

図51は図46に示したヒト型ペプチドのアルドステロン分泌刺激活性の時間経過と濃度依存性を調べた結果を示す。縦軸の concentration は血中アルドステロンの濃度 (ng/mi) を示す。横軸の Time (min) は投与後の時間 (分) を示す。□は生理食塩水 (vehicle) を投与した場合、■はヒト型ペプチド4nmol/kg を投与した場合、▲はヒト型ペプチド40nmol/kg を投与した場合、×はヒト型ペプチド400nmol/kg を投与した場合を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の分泌蛋白質としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、ヒトや温血動

- 物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来する蛋白質であつてもよく、合成蛋白質であつてもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列としては、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列が挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(N

ational Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; マトリクス=BLOSUM62 ; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。

また、配列番号 : 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列としては、

- (i) 配列番号 : 1、配列番号 : 3、配列番号 : 5 または配列番号 : 7 (以下、アミノ酸配列 X と略記する)、
- 10 (ii) アミノ酸配列 X 中の 1 ~ 30 個 (例えば 1 ~ 15 個、好ましくは 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個、特に好ましくは 1 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
- (iii) アミノ酸配列 X に 1 ~ 30 個 (例えば 1 ~ 15 個、好ましくは 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個、特に好ましくは 1 15 個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
- (iv) アミノ酸配列 X に 1 ~ 30 個 (例えば 1 ~ 15 個、好ましくは 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個、特に好ましくは 1 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
- (v) アミノ酸配列 X 中の 1 ~ 30 個 (例えば 1 ~ 15 個、好ましくは 1 ~ 10 20 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個、特に好ましくは 1 個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、
- (vi) 上記 (ii) ~ (v) を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の分泌蛋白質の具体例としては、例えば、

- (1) 配列番号 : 1 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト型分泌蛋白質、
- 25 (2) 配列番号 : 3 で表わされるアミノ酸配列からなるラット型分泌蛋白質、
- (3) 配列番号 : 5 で表わされるアミノ酸配列からなるマウス型分泌蛋白質、
- (4) 配列番号 : 7 で表わされるアミノ酸配列からなるウシ型分泌蛋白質などが挙げられる。

配列番号 : 1 で表わされるアミノ酸配列の第 1 番目 ~ 18 番目のアミノ酸配

列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第1番目～17番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

5 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第1番目～17番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第1番目～17番目のアミノ酸配列は分泌シグナル配列を示す。

したがって、本発明の分泌蛋白質は、上記したアミノ酸配列からシグナル配列を除いたものであってもよい。

10 本発明の分泌蛋白質は、後述する本発明のペプチドと同様の活性を有していてもよい。

本発明の分泌蛋白質の部分ペプチド（以下、本発明のペプチドと略記する）としては、前記した本発明の分泌蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、通常、アミノ酸が5個以上、好ましくは10個以上からなる

15 ペプチドが好ましい。

具体的には、本発明のペプチドとしては、

（1）本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第26番目～88番目のアミノ酸配列、第80番目～88番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列と同一

20 もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（以下、本発明のヒト型ペプチドと略記する場合がある）、

（2）本発明の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一

25 もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（以下、本発明のラット型ペプチドと略記する場合がある）、

（3）本発明の配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一

もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（以下、本発明のマウス型ペプチドと略記する場合がある）、

(4) 本発明の配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第124番目～131番目のアミノ酸配列または第125番目～131番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド（以下、本発明のウシ型ペプチドと略記する場合がある）などが用いられる。

- 5 本発明のペプチドは、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、ME L, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, C
- 10 CRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するペプチドであってもよく、合成ペプチドであってもよい。

- 25 本願明細書において、アミノ酸配列Yとは、以下の10種類のアミノ酸配列から選ばれる1つのアミノ酸配列を示す。

(1) ①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第26番目～88番目のアミノ酸配列、

②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸

配列、

③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列、

5 ④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第127番目～133番目のアミノ酸配列、

(2) ①配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列、

②配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列、

10 (3) ①配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列、

②配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列、

15 (4) ①配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第124番目～131番目のアミノ酸配列、

②配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列。

20 アミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列としては、アミノ酸配列Yと約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

アミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば、前記のアミノ酸配列Yと実質的に同一のアミノ酸配列を有し、アミノ酸配列Yを有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。

25 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することが

できる。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドが有する活性（例えば、副腎皮質ホルモン分泌促進活性、受容体との結合活性、受容体発現細胞に対する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP $\gamma$ S 結合活性などを促進する活性等）等）などが挙げられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

- 10 アミノ酸配列 Y と同一または実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、
- (i) アミノ酸配列 Y、
  - (ii) アミノ酸配列 Y 中の 1～5 個（好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1～2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
  - (iii) アミノ酸配列 Y に 1～5 個（好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1
  - 15 ～2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、
  - (iv) アミノ酸配列 Y に 1～5 個（好ましくは 1～3 個、さらに好ましくは 1～2 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、
  - (v) アミノ酸配列 Y 中の 1～10 個（好ましくは 1～5 個、さらに好ましくは 1～3 個、より好ましくは、1 個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたア
  - 20 ミノ酸配列、
  - (vi) 上記 (ii) ～ (v) を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、

- (1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列の第 19 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 20 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 21 番目～88 番目のア
- 25 ミノ酸配列、第 22 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 23 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 24 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 25 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 26 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 27 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 28 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 29 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 30 番目～88 番目のアミノ酸配列、第 31 番目～8

8番目のアミノ酸配列、第32番目～88番目のアミノ酸配列、第33番目～88番目のアミノ酸配列、第34番目～88番目のアミノ酸配列、第35番目～88番目のアミノ酸配列、第36番目～88番目のアミノ酸配列、第37番目～88番目のアミノ酸配列、第38番目～88番目のアミノ酸配列、第39番目～88番目のアミノ酸配列、第40番目～88番目のアミノ酸配列、第41番目～88番目のアミノ酸配列、第42番目～88番目のアミノ酸配列、第43番目～88番目のアミノ酸配列、第44番目～88番目のアミノ酸配列、第45番目～88番目のアミノ酸配列、第46番目～88番目のアミノ酸配列、第47番目～88番目のアミノ酸配列、第48番目～88番目のアミノ酸配列、第49番目～88番目のアミノ酸配列、第50番目～88番目のアミノ酸配列、第51番目～88番目のアミノ酸配列、第52番目～88番目のアミノ酸配列、第53番目～88番目のアミノ酸配列、第54番目～88番目のアミノ酸配列、第55番目～88番目のアミノ酸配列、第56番目～88番目のアミノ酸配列、第57番目～88番目のアミノ酸配列、第58番目～88番目のアミノ酸配列、第59番目～88番目のアミノ酸配列、第60番目～88番目のアミノ酸配列、第61番目～88番目のアミノ酸配列、第62番目～88番目のアミノ酸配列、第63番目～88番目のアミノ酸配列、第64番目～88番目のアミノ酸配列、第65番目～88番目のアミノ酸配列、第66番目～88番目のアミノ酸配列、第67番目～88番目のアミノ酸配列、第68番目～88番目のアミノ酸配列、第69番目～88番目のアミノ酸配列、第70番目～88番目のアミノ酸配列、第71番目～88番目のアミノ酸配列、第72番目～88番目のアミノ酸配列、第73番目～88番目のアミノ酸配列、第74番目～88番目のアミノ酸配列、第75番目～88番目のアミノ酸配列、第76番目～88番目のアミノ酸配列、第77番目～88番目のアミノ酸配列、第78番目～88番目のアミノ酸配列、第79番目～88番目のアミノ酸配列または第80番目～88番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチド、または配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第19番目～133番目のアミノ酸配列、第20番目～133番目のアミノ酸配列、第21番目～133番目のアミノ酸配列、第22番目～133番目のアミノ酸配列、第23番目～133番目のアミノ酸配列、第24番目～133



番目のアミノ酸配列、第25番目～133番目のアミノ酸配列、第26番目～  
133番目のアミノ酸配列、第27番目～133番目のアミノ酸配列、第28  
番目～133番目のアミノ酸配列、第29番目～133番目のアミノ酸配列、  
第30番目～133番目のアミノ酸配列、第31番目～133番目のアミノ酸  
5 配列、第32番目～133番目のアミノ酸配列、第33番目～133番目のア  
ミノ酸配列、第34番目～133番目のアミノ酸配列、第35番目～133番  
目のアミノ酸配列、第36番目～133番目のアミノ酸配列、第37番目～1  
33番目のアミノ酸配列、第38番目～133番目のアミノ酸配列、第39番  
目～133番目のアミノ酸配列、第40番目～133番目のアミノ酸配列、第  
10 41番目～133番目のアミノ酸配列、第42番目～133番目のアミノ酸配  
列、第43番目～133番目のアミノ酸配列、第44番目～133番目のアミ  
ノ酸配列、第45番目～133番目のアミノ酸配列、第46番目～133番目  
のアミノ酸配列、第47番目～133番目のアミノ酸配列、第48番目～13  
3番目のアミノ酸配列、第49番目～133番目のアミノ酸配列、第50番目  
15 ～133番目のアミノ酸配列、第51番目～133番目のアミノ酸配列、第5  
2番目～133番目のアミノ酸配列、第53番目～133番目のアミノ酸配列、  
第54番目～133番目のアミノ酸配列、第55番目～133番目のアミノ酸  
配列、第56番目～133番目のアミノ酸配列、第57番目～133番目のア  
ミノ酸配列、第58番目～133番目のアミノ酸配列、第59番目～133番  
20 目のアミノ酸配列、第60番目～133番目のアミノ酸配列、第61番目～1  
33番目のアミノ酸配列、第62番目～133番目のアミノ酸配列、第63番  
目～133番目のアミノ酸配列、第64番目～133番目のアミノ酸配列、第  
65番目～133番目のアミノ酸配列、第66番目～133番目のアミノ酸配  
列、第67番目～133番目のアミノ酸配列、第68番目～133番目のアミ  
25 ノ酸配列、第69番目～133番目のアミノ酸配列、第70番目～133番目  
のアミノ酸配列、第71番目～133番目のアミノ酸配列、第72番目～13  
3番目のアミノ酸配列、第73番目～133番目のアミノ酸配列、第74番目  
～133番目のアミノ酸配列、第75番目～133番目のアミノ酸配列、第7  
6番目～133番目のアミノ酸配列、第77番目～133番目のアミノ酸配列、

第78番目～133番目のアミノ酸配列、第79番目～133番目のアミノ酸配列、第80番目～133番目のアミノ酸配列、第81番目～133番目のアミノ酸配列、第82番目～133番目のアミノ酸配列、第83番目～133番目のアミノ酸配列、第84番目～133番目のアミノ酸配列、第85番目～133番目のアミノ酸配列、第86番目～133番目のアミノ酸配列、第87番目～133番目のアミノ酸配列、第88番目～133番目のアミノ酸配列、第89番目～133番目のアミノ酸配列、第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第92番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～133番目のアミノ酸配列、第94番目～133番目のアミノ酸配列、第95番目～133番目のアミノ酸配列、第96番目～133番目のアミノ酸配列、第97番目～133番目のアミノ酸配列、第98番目～133番目のアミノ酸配列、第99番目～133番目のアミノ酸配列、第100番目～133番目のアミノ酸配列、第101番目～133番目のアミノ酸配列、第102番目～133番目のアミノ酸配列、第103番目～133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第105番目～133番目のアミノ酸配列、第106番目～133番目のアミノ酸配列、第107番目～133番目のアミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸配列、第110番目～133番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第112番目～133番目のアミノ酸配列、第113番目～133番目のアミノ酸配列、第114番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目のアミノ酸配列、第116番目～133番目のアミノ酸配列、第117番目～133番目のアミノ酸配列、第118番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第120番目～133番目のアミノ酸配列、第121番目～133番目のアミノ酸配列、第122番目～133番目のアミノ酸配列、第123番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第125番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチド（なかでも配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第

26番目～88番目のアミノ酸配列、第80番目～88番目のアミノ酸配列、  
第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸  
配列、第93番目～133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目の  
アミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～1  
5 33番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第11  
5番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配  
列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目ま  
たは第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチドなどが  
好ましく、特に配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133  
10 番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～  
133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第1  
08番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸  
配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目  
のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～  
15 133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目または第127番目～  
133番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチドなどが好ましく、配列番  
号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列か  
らなるペプチドはN末端のグルタミン残基（Gln）がピログルタミン化され  
ていてもよく、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133  
20 番目のアミノ酸配列からなるペプチドはN末端のアルギニン残基（Arg）が  
チロシン残基（Tyr）に置換されていてもよい（図47および図48参照）、  
（2）配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第18番目～122番目のア  
ミノ酸配列、第19番目～122番目のアミノ酸配列、第20番目～122番  
目のアミノ酸配列、第21番目～122番目のアミノ酸配列、第22番目～1  
25 22番目のアミノ酸配列、第23番目～122番目のアミノ酸配列、第24番  
目～122番目のアミノ酸配列、第25番目～122番目のアミノ酸配列、第  
26番目～122番目のアミノ酸配列、第27番目～122番目のアミノ酸配  
列、第28番目～122番目のアミノ酸配列、第29番目～122番目のアミ  
ノ酸配列、第30番目～122番目のアミノ酸配列、第31番目～122番目

のアミノ酸配列、第32番目～122番目のアミノ酸配列、第33番目～122番目のアミノ酸配列、第34番目～122番目のアミノ酸配列、第35番目～122番目のアミノ酸配列、第36番目～122番目のアミノ酸配列、第37番目～122番目のアミノ酸配列、第38番目～122番目のアミノ酸配列、  
5 第39番目～122番目のアミノ酸配列、第40番目～122番目のアミノ酸配列、第41番目～122番目のアミノ酸配列、第42番目～122番目のアミノ酸配列、第43番目～122番目のアミノ酸配列、第44番目～122番目のアミノ酸配列、第45番目～122番目のアミノ酸配列、第46番目～122番目のアミノ酸配列、第47番目～122番目のアミノ酸配列、第48番  
10 目～122番目のアミノ酸配列、第49番目～122番目のアミノ酸配列、第50番目～122番目のアミノ酸配列、第51番目～122番目のアミノ酸配列、第52番目～122番目のアミノ酸配列、第53番目～122番目のアミノ酸配列、第54番目～122番目のアミノ酸配列、第55番目～122番目のアミノ酸配列、第56番目～122番目のアミノ酸配列、第57番目～12  
15 2番目のアミノ酸配列、第58番目～122番目のアミノ酸配列、第59番目～122番目のアミノ酸配列、第60番目～122番目のアミノ酸配列、第61番目～122番目のアミノ酸配列、第62番目～122番目のアミノ酸配列、第63番目～122番目のアミノ酸配列、第64番目～122番目のアミノ酸配列、第65番目～122番目のアミノ酸配列、第66番目～122番目のア  
20 ミノ酸配列、第67番目～122番目のアミノ酸配列、第68番目～122番目のアミノ酸配列、第69番目～122番目のアミノ酸配列、第70番目～122番目のアミノ酸配列、第71番目～122番目のアミノ酸配列、第72番目～122番目のアミノ酸配列、第73番目～122番目のアミノ酸配列、第74番目～122番目のアミノ酸配列、第75番目～122番目のアミノ酸配  
25 列、第76番目～122番目のアミノ酸配列、第77番目～122番目のアミノ酸配列、第78番目～122番目のアミノ酸配列、第79番目～122番目のアミノ酸配列、第80番目～122番目のアミノ酸配列、第81番目～122番目のアミノ酸配列、第82番目～122番目のアミノ酸配列、第83番目～122番目のアミノ酸配列、第84番目～122番目のアミノ酸配列、第8

5 番目～122番目のアミノ酸配列、第86番目～122番目のアミノ酸配列、  
第87番目～122番目のアミノ酸配列、第88番目～122番目のアミノ酸  
配列、第89番目～122番目のアミノ酸配列、第90番目～122番目のア  
ミノ酸配列、第91番目～122番目のアミノ酸配列、第92番目～122番  
5 目のアミノ酸配列、第93番目～122番目のアミノ酸配列、第94番目～1  
22番目のアミノ酸配列、第95番目～122番目のアミノ酸配列、第96番  
目～122番目のアミノ酸配列、第97番目～122番目のアミノ酸配列、第  
98番目～122番目のアミノ酸配列、第99番目～122番目のアミノ酸配  
列、第100番目～122番目のアミノ酸配列、第101番目～122番目の  
10 アミノ酸配列、第102番目～122番目のアミノ酸配列、第103番目～1  
22番目のアミノ酸配列、第104番目～122番目のアミノ酸配列、第10  
5番目～122番目のアミノ酸配列、第106番目～122番目のアミノ酸配  
列、第107番目～122番目のアミノ酸配列、第108番目～122番目の  
アミノ酸配列、第109番目～122番目のアミノ酸配列、第110番目～1  
15 22番目のアミノ酸配列、第111番目～122番目のアミノ酸配列、第11  
2番目～122番目のアミノ酸配列、第113番目～122番目のアミノ酸配  
列、第114番目～122番目のアミノ酸配列、第115番目～122番目の  
アミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列からなるラット  
型ペプチド（なかでも配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第115番目  
20 ～122番目のアミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列  
からなるラット型ペプチドなどが好ましい）、

（3）配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第18番目～122番目のア  
ミノ酸配列、第19番目～122番目のアミノ酸配列、第20番目～122番  
目のアミノ酸配列、第21番目～122番目のアミノ酸配列、第22番目～1  
25 22番目のアミノ酸配列、第23番目～122番目のアミノ酸配列、第24番  
目～122番目のアミノ酸配列、第25番目～122番目のアミノ酸配列、第  
26番目～122番目のアミノ酸配列、第27番目～122番目のアミノ酸配  
列、第28番目～122番目のアミノ酸配列、第29番目～122番目のアミ  
ノ酸配列、第30番目～122番目のアミノ酸配列、第31番目～122番目

のアミノ酸配列、第32番目～122番目のアミノ酸配列、第33番目～122番目のアミノ酸配列、第34番目～122番目のアミノ酸配列、第35番目～122番目のアミノ酸配列、第36番目～122番目のアミノ酸配列、第37番目～122番目のアミノ酸配列、第38番目～122番目のアミノ酸配列、  
5 第39番目～122番目のアミノ酸配列、第40番目～122番目のアミノ酸配列、第41番目～122番目のアミノ酸配列、第42番目～122番目のアミノ酸配列、第43番目～122番目のアミノ酸配列、第44番目～122番目のアミノ酸配列、第45番目～122番目のアミノ酸配列、第46番目～122番目のアミノ酸配列、第47番目～122番目のアミノ酸配列、第48番  
10 目～122番目のアミノ酸配列、第49番目～122番目のアミノ酸配列、第50番目～122番目のアミノ酸配列、第51番目～122番目のアミノ酸配列、第52番目～122番目のアミノ酸配列、第53番目～122番目のアミノ酸配列、第54番目～122番目のアミノ酸配列、第55番目～122番目のアミノ酸配列、第56番目～122番目のアミノ酸配列、第57番目～12  
15 2番目のアミノ酸配列、第58番目～122番目のアミノ酸配列、第59番目～122番目のアミノ酸配列、第60番目～122番目のアミノ酸配列、第61番目～122番目のアミノ酸配列、第62番目～122番目のアミノ酸配列、第63番目～122番目のアミノ酸配列、第64番目～122番目のアミノ酸配列、第65番目～122番目のアミノ酸配列、第66番目～122番目のア  
20 ミノ酸配列、第67番目～122番目のアミノ酸配列、第68番目～122番目のアミノ酸配列、第69番目～122番目のアミノ酸配列、第70番目～122番目のアミノ酸配列、第71番目～122番目のアミノ酸配列、第72番目～122番目のアミノ酸配列、第73番目～122番目のアミノ酸配列、第74番目～122番目のアミノ酸配列、第75番目～122番目のアミノ酸配  
25 列、第76番目～122番目のアミノ酸配列、第77番目～122番目のアミノ酸配列、第78番目～122番目のアミノ酸配列、第79番目～122番目のアミノ酸配列、第80番目～122番目のアミノ酸配列、第81番目～122番目のアミノ酸配列、第82番目～122番目のアミノ酸配列、第83番目～122番目のアミノ酸配列、第84番目～122番目のアミノ酸配列、第8

5 5番目～122番目のアミノ酸配列、第86番目～122番目のアミノ酸配列、  
第87番目～122番目のアミノ酸配列、第88番目～122番目のアミノ酸  
配列、第89番目～122番目のアミノ酸配列、第90番目～122番目のア  
ミノ酸配列、第91番目～122番目のアミノ酸配列、第92番目～122番  
5 目のアミノ酸配列、第93番目～122番目のアミノ酸配列、第94番目～1  
22番目のアミノ酸配列、第95番目～122番目のアミノ酸配列、第96番  
目～122番目のアミノ酸配列、第97番目～122番目のアミノ酸配列、第  
98番目～122番目のアミノ酸配列、第99番目～122番目のアミノ酸配  
列、第100番目～122番目のアミノ酸配列、第101番目～122番目の  
10 アミノ酸配列、第102番目～122番目のアミノ酸配列、第103番目～1  
22番目のアミノ酸配列、第104番目～122番目のアミノ酸配列、第10  
5番目～122番目のアミノ酸配列、第106番目～122番目のアミノ酸配  
列、第107番目～122番目のアミノ酸配列、第108番目～122番目の  
アミノ酸配列、第109番目～122番目のアミノ酸配列、第110番目～1  
15 22番目のアミノ酸配列、第111番目～122番目のアミノ酸配列、第11  
2番目～122番目のアミノ酸配列、第113番目～122番目のアミノ酸配  
列、第114番目～122番目のアミノ酸配列、第115番目～122番目の  
アミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列からなるマウス  
型ペプチド（なかでも配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第115番目  
20 ～122番目のアミノ酸配列または第116番目～122番目のアミノ酸配列  
からなるペプチドなどが好ましい）、

（4）配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第18番目～131番目のア  
ミノ酸配列、第19番目～131番目のアミノ酸配列、第20番目～131番  
目のアミノ酸配列、第21番目～131番目のアミノ酸配列、第22番目～1  
25 31番目のアミノ酸配列、第23番目～131番目のアミノ酸配列、第24番  
目～131番目のアミノ酸配列、第25番目～131番目のアミノ酸配列、第  
26番目～131番目のアミノ酸配列、第27番目～131番目のアミノ酸配  
列、第28番目～131番目のアミノ酸配列、第29番目～131番目のアミ  
ノ酸配列、第30番目～131番目のアミノ酸配列、第31番目～131番目

のアミノ酸配列、第32番目～131番目のアミノ酸配列、第33番目～131番目のアミノ酸配列、第34番目～131番目のアミノ酸配列、第35番目～131番目のアミノ酸配列、第36番目～131番目のアミノ酸配列、第37番目～131番目のアミノ酸配列、第38番目～131番目のアミノ酸配列、  
5 第39番目～131番目のアミノ酸配列、第40番目～131番目のアミノ酸配列、第41番目～131番目のアミノ酸配列、第42番目～131番目のアミノ酸配列、第43番目～131番目のアミノ酸配列、第44番目～131番目のアミノ酸配列、第45番目～131番目のアミノ酸配列、第46番目～131番目のアミノ酸配列、第47番目～131番目のアミノ酸配列、第48番  
10 目～131番目のアミノ酸配列、第49番目～131番目のアミノ酸配列、第50番目～131番目のアミノ酸配列、第51番目～131番目のアミノ酸配列、第52番目～131番目のアミノ酸配列、第53番目～131番目のアミノ酸配列、第54番目～131番目のアミノ酸配列、第55番目～131番目のアミノ酸配列、第56番目～131番目のアミノ酸配列、第57番目～13  
15 1番目のアミノ酸配列、第58番目～131番目のアミノ酸配列、第59番目～131番目のアミノ酸配列、第60番目～131番目のアミノ酸配列、第61番目～131番目のアミノ酸配列、第62番目～131番目のアミノ酸配列、第63番目～131番目のアミノ酸配列、第64番目～131番目のアミノ酸配列、第65番目～131番目のアミノ酸配列、第66番目～131番目のア  
20 ミノ酸配列、第67番目～131番目のアミノ酸配列、第68番目～131番目のアミノ酸配列、第69番目～131番目のアミノ酸配列、第70番目～131番目のアミノ酸配列、第71番目～131番目のアミノ酸配列、第72番目～131番目のアミノ酸配列、第73番目～131番目のアミノ酸配列、第74番目～131番目のアミノ酸配列、第75番目～131番目のアミノ酸配  
25 列、第76番目～131番目のアミノ酸配列、第77番目～131番目のアミノ酸配列、第78番目～131番目のアミノ酸配列、第79番目～131番目のアミノ酸配列、第80番目～131番目のアミノ酸配列、第81番目～131番目のアミノ酸配列、第82番目～131番目のアミノ酸配列、第83番目～131番目のアミノ酸配列、第84番目～131番目のアミノ酸配列、第8



5 5番目～131番目のアミノ酸配列、第86番目～131番目のアミノ酸配列、  
第87番目～131番目のアミノ酸配列、第88番目～131番目のアミノ酸  
配列、第89番目～131番目のアミノ酸配列、第90番目～131番目のア  
ミノ酸配列、第91番目～131番目のアミノ酸配列、第92番目～131番  
5 目のアミノ酸配列、第93番目～131番目のアミノ酸配列、第94番目～1  
31番目のアミノ酸配列、第95番目～131番目のアミノ酸配列、第96番  
目～131番目のアミノ酸配列、第97番目～131番目のアミノ酸配列、第  
98番目～131番目のアミノ酸配列、第99番目～131番目のアミノ酸配  
列、第100番目～131番目のアミノ酸配列、第101番目～131番目の  
10 アミノ酸配列、第102番目～131番目のアミノ酸配列、第103番目～1  
31番目のアミノ酸配列、第104番目～131番目のアミノ酸配列、第10  
5番目～131番目のアミノ酸配列、第106番目～131番目のアミノ酸配  
列、第107番目～131番目のアミノ酸配列、第108番目～131番目の  
アミノ酸配列、第109番目～131番目のアミノ酸配列、第110番目～1  
15 31番目のアミノ酸配列、第111番目～131番目のアミノ酸配列、第11  
2番目～131番目のアミノ酸配列、第113番目～131番目のアミノ酸配  
列、第114番目～131番目のアミノ酸配列、第115番目～131番目の  
アミノ酸配列、第116番目～131番目のアミノ酸配列、第117番目～1  
31番目のアミノ酸配列、第118番目～131番目のアミノ酸配列、第11  
20 9番目～131番目のアミノ酸配列、第120番目～131番目のアミノ酸配  
列、第121番目～131番目のアミノ酸配列、第122番目～131番目の  
アミノ酸配列、第123番目～131番目のアミノ酸配列、第124番目～1  
31番目のアミノ酸配列または第125番目～131番目のアミノ酸配列から  
なるウシ型ペプチドI（なかでも配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第  
25 124番目～131番目のアミノ酸配列または第125番目～131番目のア  
ミノ酸配列からなるペプチドなどが好ましい）などが挙げられる。

これらのペプチドとしては、C末端のアミド体が好ましく用いられる。

本願明細書において、上記のヒト型、ラット型、マウス型およびウシ型ペ  
プチドを本発明のペプチドと総称する。

本発明の分泌蛋白質または本発明のペプチド（以下、本発明のペプチドと略記する場合がある）は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。

- 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列からなる分泌蛋白質をはじめとする、  
5 本発明のペプチドはC末端はカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、  
10  $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 15 本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残  
20 基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されて  
25 いるもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学

的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。以下、塩も含めて、本発明のペプチドと称する。

5 本発明のペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

10 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製単離することができる。

15 本発明のペプチドまたはそれらのアミド体の合成には、通常市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このよ  
20 うな樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮  
25 合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の本発明のペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジ

イミド類としては、DCC、N，N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt，HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N，N-ジメチルホルムアミド、N，N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘ

プチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、  
5 t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが  
10 用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl<sub>2</sub>-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

15 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、  
20 2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

25 保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニ

ア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオール  
5 などのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア  
10 ンアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明のペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カル  
15 ボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したペプチドとを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮  
20 合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の本発明のペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ  
25 酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、本発明のペプチドのアミド体と同様にして、所望の本発明のペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の分泌蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することが

できる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドの部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑥に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

②Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる本発明のペプチドの部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のペプチドをコードする塩基配列 (DNA または RNA、好ましくは DNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のペプチドをコードする DNA、mRNA 等の RNA であり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖 DNA、二本鎖 RNA または DNA:RNA のハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のペプチドのmRNAを定量することができる。

- 5      本発明のペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

- 10      ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

- 15      本願明細書において、塩基配列Pとは、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 および配列番号：8 から選ばれる1つの配列番号で表される塩基配列を示す。

本願明細書において、塩基配列Qとは、以下の4種類の塩基配列から選ばれる1つの塩基配列を示す。

- 20      (1) 配列番号：2 で表わされる塩基配列の第55番目～408番目の塩基配列、  
         (2) 配列番号：4 で表わされる塩基配列の第52番目～372番目の塩基配列、  
         (3) 配列番号：6 で表わされる塩基配列の第52番目～372番目の塩基配列、  
25      (4) 配列番号：8 で表わされる塩基配列の第52番目～402番目の塩基配列。

本発明の分泌蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、塩基配列PまたはQを含有するDNAの塩基配列を有するDNA、または塩基配列PまたはQ



とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明の分泌蛋白質と実質的に同質の活性を有する分泌蛋白質をコードするDNAの塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

5 塩基配列PまたはQとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、塩基配列PまたはQと約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列などが用いられる。

10 塩基配列の同一性は、同一性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

15 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリン  
20 ジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

25 より具体的には、

(1) 配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号: 2 で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(2) 配列番号: 3 で表わされるアミノ酸配列からなるラット型分泌蛋白質をコ

ードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(3)配列番号：5で表わされるアミノ酸配列からなるマウス型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(4)配列番号：7で表わされるアミノ酸配列からなるウシ型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(5)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第19番目～136番目のアミノ酸配列からなるヒト型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列の第55番目～408番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(6)配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第18番目～124番目のアミノ酸配列からなるラット型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列の第52番目～372番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(7)配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第18番目～124番目のアミノ酸配列からなるマウス型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列の第52番目～372番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(8)配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第18番目～134番目のアミノ酸配列からなるウシ型分泌蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列の第52番目～402番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本願明細書において、塩基配列Rとは、以下の10種類の塩基配列から選ばれる1つの塩基配列を示す。

(1)①配列番号：2で表わされる塩基配列の第76番目～264番目の塩基配列、

②配列番号：2で表わされる塩基配列の第238番目～264番目の塩基配列、

③配列番号：2で表わされる塩基配列の第271番目～399番目の塩基配列、

④配列番号：2で表わされる塩基配列の第379番目～399番目の塩基配列、

(2) ①配列番号：4で表わされる塩基配列の第343番目～366番目の塩基配列、

5 ②配列番号：4で表わされる塩基配列の第346番目～366番目の塩基配列、

(3) ①配列番号：6で表わされる塩基配列の第343番目～366番目の塩基配列、

②配列番号：6で表わされる塩基配列の第346番目～366番目の塩基配列、

(4) ①配列番号：8で表わされる塩基配列の第370番目～393番目の塩基配列、

10

②配列番号：8で表わされる塩基配列の第373番目～393番目の塩基配列。

本発明のペプチドをコードするDNAとしては、例えば塩基配列Rとハイス  
トリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のペ  
プチドと実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAなどであれ  
ば何れのものでもよい。

15

塩基配列Rとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配  
列としては、例えば、塩基配列Rと約70%以上、好ましくは約80%以上、  
より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有す  
る塩基配列などが用いられる。

20

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (Na  
tional Center for Biotechnology Inf  
ormation Basic Local Alignment Sear  
ch Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; ギャップを許す; フィ  
ルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算す  
ることができる。

25

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と  
同様のものが用いられる。

より具体的には、

(1) (i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第26番目～88番目の

アミノ酸配列からなるヒト型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列の第76番目～264番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(ii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2  
5 で表わされる塩基配列の第238番目～264番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(iii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2  
10 で表わされる塩基配列の第271番目～399番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(iv) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるヒト型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列の第379番目～399番目の塩基配列からなる  
15 DNAなどが用いられる。

(2) (i) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列からなるラット型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列の第343番目～366番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(ii) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列からなるラット型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列の第346番目～366番目の塩基配列からなる  
20 DNAなどが用いられる。

(3) (i) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第115番目～122番目のアミノ酸配列からなるマウス型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列の第343番目～366番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(ii) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列からなるマウス型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号

号：6で表わされる塩基配列の第346番目～366番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

(4) (i) 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第124番目～131番目のアミノ酸配列からなるウシ型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列の第370番目～393番目の塩基配列からなるDNAなどが、

(ii) 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列からなるウシ型ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：8で表わされる塩基配列の第373番目～393番目の塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、本発明のペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のペプチド遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定された本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のペプチド遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連RNAとの相互作用を介して本発明のペプチド遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のペプチド関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のペプチド関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のペプチド遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にある

ペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。本発明のペプチド遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6ーベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本発明のペプチド遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるといふことができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2ーデオキシーDーリ  
10    ボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、Dーリボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のNーグリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2  
15    本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば  
20    当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホ  
25    ロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属

など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを  
5 含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってもよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変  
10 換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、  
15 それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

20 こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、  
25 結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホス

- ホリピド、コレステロールなど)といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド
- 5 結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、R N a s e などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護
- 10 基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のペプチドの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

- 15 本発明のペプチドをコードするDNAは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの(例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識)、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。

- 本発明のペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、
- 20 本発明のペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・
- 25 クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km



(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

10 本発明のペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

20 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

25 これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス

菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

5 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、  
10 アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neorと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含  
15 含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である  
20 場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

25 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl.

Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7 (COS7), Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞

と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル. 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または

有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

5 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor LaboHumanory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

15 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約

5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔ウイルス学 (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 15 本発明のペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 25 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせることで行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の

差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

5       なお、組換え体が産生する本発明のペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、  
10     グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明のペプチドに対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のペプチドに対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

15     本発明のペプチドに対する抗体は、本発明のペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

20     本発明のペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

25     モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の

標識化ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが

5 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1 : 10 1 ~ 20 : 1 程度であり、PEG (好ましくはPEG1000 ~ PEG6000) が10 ~ 80 % 程度の濃度で添加され、20 ~ 40 °C、好ましくは30 ~ 37 °C で1 ~ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が

15 使用できるが、例えば、ペプチド (蛋白質) 抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、

20 抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地

25 としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1 ~ 20 %、好ましくは10 ~ 20 % の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1 ~ 10 % の牛胎児血清を含むGIT培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製



葉（株）などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定  
5 できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原  
10 結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ペプチド抗原）自体、ある  
15 いはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

20 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、  
25 約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるい

は担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

- ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、  
5 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

- 10 本発明のペプチドをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

- 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが  
20 あげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、①本発明のペプチド、②本発明のDNA、③本発明の抗体、および④アンチセンスDNAの用途を説明する。

#### （1）本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のペプチドおよびそれをコードするDNAは、安全で低毒性な医薬、

例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。

副腎皮質ホルモンとしては、アルドステロン、デオキシコルチコステロンなどの鉱質コルチコイドやコルチコステロン、コルチゾール、コルチゾン、酪酸  
5 ヒドロコルチゾンなどの糖質コルチコイドなどが挙げられ、なかでもコルチコステロン、アルドステロンが好ましい。

また、本発明のペプチドおよびそれをコードするDNAは、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

10 さらに、本発明のペプチドおよびそれをコードするDNAは、安全で低毒性な医薬、例えば、男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。

男性ホルモンとしては、テストステロンが挙げられる。

また、本発明のペプチドおよびそれをコードするDNAは、例えば、男性性  
15 腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

本発明のペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のペプチドを発現させることによって、  
20 （ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のペプチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

25 本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認めら

れる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80™、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、

ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

10      このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドを経口投与する場合、一般的に成人  
15      （体重60kgとして）においては、一日につき該ペプチドを約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該ペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のペプチドを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該ペプチドを約0.0  
20      1～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

#### （2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のペプチドは、本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物  
25      またはその塩のスクリーニング方法に使用することができる。本発明のペプチドの機能としては、AQ27受容体への結合作用、AQ27受容体を介するシグナル伝達作用、後述する細胞刺激活性などが挙げられる。

また、本発明のDNAは、本発明のペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法に使用することができる。

以下に、本発明のペプチドまたは本発明のDNAを用いるスクリーニング方法を具体的に説明する。

(2-1) A Q 2 7 受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

- 5     該スクリーニングは、本発明のペプチドを用いるか、または組換え型本発明のペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩をスクリーニングすることができる。
- 10     このような化合物には、本発明のペプチドの A Q 2 7 受容体を介した細胞刺激活性を有する化合物（すなわち A Q 2 7 受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（すなわち A Q 2 7 受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「結合性を変化させる」とは、本発明のペプチド A Q 2 7 受容体との結合を阻害する場合と促進する場合の両方を包含するものである。
- 15     A Q 2 7 受容体を介する細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 c AMP 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下、G T P  $\gamma$  S 結合活性、副腎皮質ホルモン分泌作用、男性ホルモン分泌作用などを促進する活性または抑制する活性などが
- 20     挙げられ、特に細胞内 c AMP 生成抑制活性、副腎皮質ホルモン分泌促進活性、男性ホルモン分泌促進活性が好ましい。
- すなわち、本発明は、
- 本発明のペプチドを用いることを特徴とする本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、具体的には、
- 25     (i) 本発明のペプチドおよび（または）A Q 2 7 受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に A Q 2 7 受容体と略称する）を用いることを特徴とする副腎皮質ホルモン分泌調節薬（例、副腎皮質ホルモン分泌促進薬、副腎皮質ホルモン分泌阻害薬）のスクリーニング方法、
- (ii) A Q 2 7 受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に A Q 2 7

受容体と略称する)に、本発明のペプチドを接触させた場合と (ii) A Q 2 7 受容体に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体の結合性を変化させる化合物 (本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) A Q 2 7 受容体に、本発明のペプチドを接触させた場合と (ii) A Q 2 7 受容体に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば A Q 2 7 受容体に対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

10 本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のペプチドを、A Q 2 7 受容体に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を A Q 2 7 受容体に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの A Q 2 7 受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物 (本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング方法、

②標識した本発明のペプチドを、A Q 2 7 受容体を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を A Q 2 7 受容体を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物 (本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のペプチドを、A Q 2 7 受容体をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した A Q 2 7 受容体に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物を A Q 2 7 受容体をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した A Q 2 7 受容体に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの A Q 2 7 受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本

発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を变化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

④A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩（例えば、本発明のペプチド）をA Q 2 7受容体を含有する細胞に接触させた場合と、A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物をA Q 2 7受容体を含有する細胞（例、CHO細胞）に接触させた場合における、A Q 2 7受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を变化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩（例えば、本発明のペプチドなど）をA Q 2 7受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したA Q 2 7受容体に接触させた場合と、A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を、A Q 2 7受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したA Q 2 7受容体に接触させた場合における、A Q 2 7受容体を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を变化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるA Q 2 7受容体としては、本発明のペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたA Q 2 7受容体などが適している。A Q 2 7受容体は、公知の方法に従って製造することができる。

本発明のスクリーニング方法において、A Q 2 7受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

A Q 2 7受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、



ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

AQ27受容体を含有する細胞としては、AQ27受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、AQ27受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500~3000 rpm)で短時間(通常、約1~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000~30000 rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したAQ27受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該AQ27受容体を含有する細胞や膜画分中のAQ27受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物(本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物)またはその塩をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、適当なAQ27受容体画分と、標識した本発明のペプチドなどが用いられる。AQ27受容体画分としては、天然型のAQ27受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型AQ27受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合

活性などを示す。標識した本発明のペプチドとしては、例えば [ $^3\text{H}$ ]、 [ $^{125}\text{I}$ ]、 [ $^{14}\text{C}$ ]、 [ $^{35}\text{S}$ ] などで標識された本発明のペプチドやそのアナログ化合物などを利用することができる。このうち好ましくは、 [ $^{125}\text{I}$ ] で標識された本発明のペプチドである。

- 5      具体的には、本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングを行うには、まず A Q 2 7 受容体を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（望ましくは pH 6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガ
- 10      ンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッ
- 15      ファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる A Q 2 7 受容体や本発明のペプチドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペ
- 20      プチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10 ml の該レセプター溶液に、一定量（5000~50000 cpm）の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に  $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$  M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は 0~
- 25      50℃、望ましくは 4~37℃で 20分~24時間、望ましくは 30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を 100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば 50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のペプチドと A Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩をスクリーニングする前記の①~③の方法を実施するためには、A Q 2 7 受容体を介する細胞

5 激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。  
具体的には、まず、AQ27受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して  
10 一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、cAMP、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なAQ27受容体を発現した細胞が必要である。AQ27受容体を発現した細胞としては、前述のAQ27受容体発現細胞株などが望ましい。

15 試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものが用いられる。

また、試験化合物としては、AQ27受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。AQ27受容体の活性部位の原子  
20 座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

さらに、本発明のペプチドに代えて、本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩をリガンドとして用いることもできる。本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物または  
25 その塩は、例えば、リガンドとして本発明のペプチドを用いて、前述した本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。

本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング用キットは、AQ27受容体またはその塩、AQ27受容体の部分ペプチド

またはその塩、A Q 2 7 受容体を含有する細胞、あるいはA Q 2 7 受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### 5 ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### 10 ②A Q 2 7 受容体標品

A Q 2 7 受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

15 [3H]、[125I]、[14C]、[35S]などで標識した本発明のペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。

##### ④リガンド標準液

本発明のペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

#### 20 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したA Q 2 7 受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

25 ② $10^{-3}$ ~ $10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5  $\mu$ l加えた後、標識した本発明のペプチドを5  $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mの本発明のペプチドを5  $\mu$ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

5      PMB : Percent Maximum Binding

B      : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub>    : 最大結合量

10      本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチドとAQ27受容体との結合を変化させる化合物（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物）またはその塩であり、具体的にはAQ27受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるAQ27受容体アゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆるAQ27受容体アンタゴニスト）である。

15      本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

20      該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、25      酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

上記AQ27受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 例えば、前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・

アッセイを行い、本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物またはその塩を得た後、該化合物またはその塩が上記したA Q 2 7受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アゴニスト  
5 であり、該活性を有しない化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物（例、前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩）をA Q 2 7受容体を含有する細胞（例、  
10 C H O細胞）に接触させ、上記A Q 2 7受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アゴニストである。

(b) A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩（例えば、本発明のペプチドアゴニストなど）をA Q 2 7受容体を含有する細胞に接触させた場合と、  
15 A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物（例、前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩）をA Q 2 7受容体を含有する細胞に接触させた場合における、A Q 2 7受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。A Q 2 7受容体を活性化する  
20 化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アンタゴニストである。

(c) 試験化合物（例、前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドとA Q 2 7受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩）を非哺乳動物（例、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ）に投与し、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を  
25 測定する。血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を上昇させる化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アゴニストである。一方、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を減少させる化合物またはその塩はA Q 2 7受容体アンタゴニストである。

(d) A Q 2 7 受容体を活性化する化合物またはその塩（例えば、本発明のペプチドアゴニストなど）を非ヒト哺乳動物（例、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ）に投与した場合と、A Q 2 7 受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を非ヒト哺乳動物（例、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ）に投与した場合における、血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの濃度を測定し、比較する。A Q 2 7 受容体を活性化する化合物による血中の副腎皮質ホルモンまたは男性ホルモンの分泌促進作用を減少させ得る化合物またはその塩はA Q 2 7 受容体アンタゴニストである。

副腎皮質ホルモン分泌作用および男性ホルモン分泌作用は、後述する実施例 1 ～ 5 に準じて測定することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる本発明のペプチドとA Q 2 7 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（本発明のペプチドの機能を促進または阻害する化合物またはその塩）は、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤として有用である。

A Q 2 7 受容体アゴニストまたは本発明のペプチドの機能を促進する化合物もしくはその塩は、A Q 2 7 受容体に対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているため、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該A Q 2 7 受容体アゴニストまたは本発明のペプチドの機能を促進する化合物もしくはその塩は、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

また、A Q 2 7 受容体アゴニストまたは本発明のペプチドの機能を促進する化合物もしくはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該A Q 2 7 受容体アゴニストまたは本発明のペプチドの機能を促進する化合物もしくはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

逆に、A Q 2 7 受容体アンタゴニストまたは本発明のペプチドの機能を阻害する化合物もしくはその塩は、A Q 2 7 受容体に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A Q 2 7 受容体アンタゴニストまたは本発明のペプチドの機能を阻害する化合物もしくはその塩は、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H 産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、A Q 2 7 受容体アンタゴニストまたは本発明のペプチドの機能を阻害する化合物もしくはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A Q 2 7 受容体アンタゴニストまたは本発明のペプチドの機能を阻害する化合物もしくはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、A Q 2 7 受容体アゴニストを経口投与する場合、一般的に成人（体重 6 0 k g 当たり）においては、一日につき A Q



27受容体アゴニストを約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、  
5 AQ27受容体アゴニストを注射剤の形で通常成人（体重60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

AQ27受容体としては、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩（以下、AQ27受容体と略記する場合がある）などが用いられる。

配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性  
5 の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、前記と同様にして測定することができる。

また、AQ27受容体としては、①配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、  
10 1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列中の  
15 1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それら欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

AQ27受容体は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、  
20 右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列からなる蛋白質をはじめとするAQ27受容体は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の  
25 何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどの

フェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 5 AQ 2 7 受容体がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、AQ 2 7 受容体には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護され
- 10
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65
- 66
- 67
- 68
- 69
- 70
- 71
- 72
- 73
- 74
- 75
- 76
- 77
- 78
- 79
- 80
- 81
- 82
- 83
- 84
- 85
- 86
- 87
- 88
- 89
- 90
- 91
- 92
- 93
- 94
- 95
- 96
- 97
- 98
- 99
- 100
- 101
- 102
- 103
- 104
- 105
- 106
- 107
- 108
- 109
- 110
- 111
- 112
- 113
- 114
- 115
- 116
- 117
- 118
- 119
- 120
- 121
- 122
- 123
- 124
- 125
- 126
- 127
- 128
- 129
- 130
- 131
- 132
- 133
- 134
- 135
- 136
- 137
- 138
- 139
- 140
- 141
- 142
- 143
- 144
- 145
- 146
- 147
- 148
- 149
- 150
- 151
- 152
- 153
- 154
- 155
- 156
- 157
- 158
- 159
- 160
- 161
- 162
- 163
- 164
- 165
- 166
- 167
- 168
- 169
- 170
- 171
- 172
- 173
- 174
- 175
- 176
- 177
- 178
- 179
- 180
- 181
- 182
- 183
- 184
- 185
- 186
- 187
- 188
- 189
- 190
- 191
- 192
- 193
- 194
- 195
- 196
- 197
- 198
- 199
- 200
- 201
- 202
- 203
- 204
- 205
- 206
- 207
- 208
- 209
- 210
- 211
- 212
- 213
- 214
- 215
- 216
- 217
- 218
- 219
- 220
- 221
- 222
- 223
- 224
- 225
- 226
- 227
- 228
- 229
- 230
- 231
- 232
- 233
- 234
- 235
- 236
- 237
- 238
- 239
- 240
- 241
- 242
- 243
- 244
- 245
- 246
- 247
- 248
- 249
- 250
- 251
- 252
- 253
- 254
- 255
- 256
- 257
- 258
- 259
- 260
- 261
- 262
- 263
- 264
- 265
- 266
- 267
- 268
- 269
- 270
- 271
- 272
- 273
- 274
- 275
- 276
- 277
- 278
- 279
- 280
- 281
- 282
- 283
- 284
- 285
- 286
- 287
- 288
- 289
- 290
- 291
- 292
- 293
- 294
- 295
- 296
- 297
- 298
- 299
- 300
- 301
- 302
- 303
- 304
- 305
- 306
- 307
- 308
- 309
- 310
- 311
- 312
- 313
- 314
- 315
- 316
- 317
- 318
- 319
- 320
- 321
- 322
- 323
- 324
- 325
- 326
- 327
- 328
- 329
- 330
- 331
- 332
- 333
- 334
- 335
- 336
- 337
- 338
- 339
- 340
- 341
- 342
- 343
- 344
- 345
- 346
- 347
- 348
- 349
- 350
- 351
- 352
- 353
- 354
- 355
- 356
- 357
- 358
- 359
- 360
- 361
- 362
- 363
- 364
- 365
- 366
- 367
- 368
- 369
- 370
- 371
- 372
- 373
- 374
- 375
- 376
- 377
- 378
- 379
- 380
- 381
- 382
- 383
- 384
- 385
- 386
- 387
- 388
- 389
- 390
- 391
- 392
- 393
- 394
- 395
- 396
- 397
- 398
- 399
- 400
- 401
- 402
- 403
- 404
- 405
- 406
- 407
- 408
- 409
- 410
- 411
- 412
- 413
- 414
- 415
- 416
- 417
- 418
- 419
- 420
- 421
- 422
- 423
- 424
- 425
- 426
- 427
- 428
- 429
- 430
- 431
- 432
- 433
- 434
- 435
- 436
- 437
- 438
- 439
- 440
- 441
- 442
- 443
- 444
- 445
- 446
- 447
- 448
- 449
- 450
- 451
- 452
- 453
- 454
- 455
- 456
- 457
- 458
- 459
- 460
- 461
- 462
- 463
- 464
- 465
- 466
- 467
- 468
- 469
- 470
- 471
- 472
- 473
- 474
- 475
- 476
- 477
- 478
- 479
- 480
- 481
- 482
- 483
- 484
- 485
- 486
- 487
- 488
- 489
- 490
- 491
- 492
- 493
- 494
- 495
- 496
- 497
- 498
- 499
- 500
- 501
- 502
- 503
- 504
- 505
- 506
- 507
- 508
- 509
- 510
- 511
- 512
- 513
- 514
- 515
- 516
- 517
- 518
- 519
- 520
- 521
- 522
- 523
- 524
- 525
- 526
- 527
- 528
- 529
- 530
- 531
- 532
- 533
- 534
- 535
- 536
- 537
- 538
- 539
- 540
- 541
- 542
- 543
- 544
- 545
- 546
- 547
- 548
- 549
- 550
- 551
- 552
- 553
- 554
- 555
- 556
- 557
- 558
- 559
- 560
- 561
- 562
- 563
- 564
- 565
- 566
- 567
- 568
- 569
- 570
- 571
- 572
- 573
- 574
- 575
- 576
- 577
- 578
- 579
- 580
- 581
- 582
- 583
- 584
- 585
- 586
- 587
- 588
- 589
- 590
- 591
- 592
- 593
- 594
- 595
- 596
- 597
- 598
- 599
- 600
- 601
- 602
- 603
- 604
- 605
- 606
- 607
- 608
- 609
- 610
- 611
- 612
- 613
- 614
- 615
- 616
- 617
- 618
- 619
- 620
- 621
- 622
- 623
- 624
- 625
- 626
- 627
- 628
- 629
- 630
- 631
- 632
- 633
- 634
- 635
- 636
- 637
- 638
- 639
- 640
- 641
- 642
- 643
- 644
- 645
- 646
- 647
- 648
- 649
- 650
- 651
- 652
- 653
- 654
- 655
- 656
- 657
- 658
- 659
- 660
- 661
- 662
- 663
- 664
- 665
- 666
- 667
- 668
- 669
- 670
- 671
- 672
- 673
- 674
- 675
- 676
- 677
- 678
- 679
- 680
- 681
- 682
- 683
- 684
- 685
- 686
- 687
- 688
- 689
- 690
- 691
- 692
- 693
- 694
- 695
- 696
- 697
- 698
- 699
- 700
- 701
- 702
- 703
- 704
- 705
- 706
- 707
- 708
- 709
- 710
- 711
- 712
- 713
- 714
- 715
- 716
- 717
- 718
- 719
- 720
- 721
- 722
- 723
- 724
- 725
- 726
- 727
- 728
- 729
- 730
- 731
- 732
- 733
- 734
- 735
- 736
- 737
- 738
- 739
- 740
- 741
- 742
- 743
- 744
- 745
- 746
- 747
- 748
- 749
- 750
- 751
- 752
- 753
- 754
- 755
- 756
- 757
- 758
- 759
- 760
- 761
- 762
- 763
- 764
- 765
- 766
- 767
- 768
- 769
- 770
- 771
- 772
- 773
- 774
- 775
- 776
- 777
- 778
- 779
- 780
- 781
- 782
- 783
- 784
- 785
- 786
- 787
- 788
- 789
- 790
- 791
- 792
- 793
- 794
- 795
- 796
- 797
- 798
- 799
- 800
- 801
- 802
- 803
- 804
- 805
- 806
- 807
- 808
- 809
- 810
- 811
- 812
- 813
- 814
- 815
- 816
- 817
- 818
- 819
- 820
- 821
- 822
- 823
- 824
- 825
- 826
- 827
- 828
- 829
- 830
- 831
- 832
- 833
- 834
- 835
- 836
- 837
- 838
- 839
- 840
- 841
- 842
- 843
- 844
- 845
- 846
- 847
- 848
- 849
- 850
- 851
- 852
- 853
- 854
- 855
- 856
- 857
- 858
- 859
- 860
- 861
- 862
- 863
- 864
- 865
- 866
- 867
- 868
- 869
- 870
- 871
- 872
- 873
- 874
- 875
- 876
- 877
- 878
- 879
- 880
- 881
- 882
- 883
- 884
- 885
- 886
- 887
- 888
- 889
- 890
- 891
- 892
- 893
- 894
- 895
- 896
- 897
- 898
- 899
- 900
- 901
- 902
- 903
- 904
- 905
- 906
- 907
- 908
- 909
- 910
- 911
- 912
- 913
- 914
- 915
- 916
- 917
- 918
- 919
- 920
- 921
- 922
- 923
- 924
- 925
- 926
- 927
- 928
- 929
- 930
- 931
- 932
- 933
- 934
- 935
- 936
- 937
- 938
- 939
- 940
- 941
- 942
- 943
- 944
- 945
- 946
- 947
- 948
- 949
- 950
- 951
- 952
- 953
- 954
- 955
- 956
- 957
- 958
- 959
- 960
- 961
- 962
- 963
- 964
- 965
- 966
- 967
- 968
- 969
- 970
- 971
- 972
- 973
- 974
- 975
- 976
- 977
- 978
- 979
- 980
- 981
- 982
- 983
- 984
- 985
- 986
- 987
- 988
- 989
- 990
- 991
- 992
- 993
- 994
- 995
- 996
- 997
- 998
- 999
- 1000
- 1001
- 1002
- 1003
- 1004
- 1005
- 1006
- 1007
- 1008
- 1009
- 1010
- 1011
- 1012
- 1013
- 1014
- 1015
- 1016
- 1017
- 1018
- 1019
- 1020
- 1021
- 1022
- 1023
- 1024
- 1025
- 1026
- 1027
- 1028
- 1029
- 1030
- 1031
- 1032
- 1033
- 1034
- 1035
- 1036
- 1037
- 1038
- 1039
- 1040
- 1041
- 1042
- 1043
- 1044
- 1045
- 1046
- 1047
- 1048
- 1049
- 1050
- 1051
- 1052
- 1053
- 1054
- 1055
- 1056
- 1057
- 1058
- 1059
- 1060
- 1061
- 1062
- 1063
- 1064
- 1065
- 1066
- 1067
- 1068
- 1069
- 1070
- 1071
- 1072
- 1073
- 1074
- 1075
- 1076
- 1077
- 1078
- 1079
- 1080
- 1081
- 1082
- 1083
- 1084
- 1085
- 1086
- 1087
- 1088
- 1089
- 1090
- 1091
- 1092
- 1093
- 1094
- 1095
- 1096
- 1097
- 1098
- 1099
- 1100
- 1101
- 1102
- 1103
- 1104
- 1105
- 1106
- 1107
- 1108
- 1109
- 1110
- 1111
- 1112
- 1113
- 1114
- 1115
- 1116
- 1117
- 1118
- 1119
- 1120
- 1121
- 1122
- 1123
- 1124
- 1125
- 1126
- 1127
- 1128
- 1129
- 1130
- 1131
- 1132
- 1133
- 1134
- 1135
- 1136
- 1137
- 1138
- 1139
- 1140
- 1141
- 1142
- 1143
- 1144
- 1145
- 1146
- 1147
- 1148
- 1149
- 1150
- 1151
- 1152
- 1153
- 1154
- 1155
- 1156
- 1157
- 1158
- 1159
- 1160
- 1161
- 1162
- 1163
- 1164
- 1165
- 1166
- 1167
- 1168
- 1169
- 1170
- 1171
- 1172
- 1173
- 1174
- 1175
- 1176
- 1177
- 1178
- 1179
- 1180
- 1181
- 1182
- 1183
- 1184
- 1185
- 1186
- 1187
- 1188
- 1189
- 1190
- 1191
- 1192
- 1193
- 1194
- 1195
- 1196
- 1197
- 1198
- 1199
- 1200
- 1201
- 1202
- 1203
- 1204
- 1205
- 1206
- 1207
- 1208
- 1209
- 1210
- 1211
- 1212
- 1213
- 1214
- 1215
- 1216
- 1217
- 1218
- 1219
- 1220
- 1221
- 1222
- 1223
- 1224
- 1225
- 1226
- 1227
- 1228
- 1229
- 1230
- 1231
- 1232
- 1233
- 1234
- 1235
- 1236
- 1237
- 1238
- 1239
- 1240
- 1241
- 1242
- 1243
- 1244
- 1245
- 1246
- 1247
- 1248
- 1249
- 1250
- 1251
- 1252
- 1253
- 1254
- 1255
- 1256
- 1257
- 1258
- 1259
- 1260
- 1261
- 1262
- 1263
- 1264
- 1265
- 1266
- 1267
- 1268
- 1269
- 1270
- 1271
- 1272
- 1273
- 1274
- 1275
- 1276
- 1277
- 1278
- 1279
- 1280
- 1281
- 1282
- 1283
- 1284
- 1285
- 1286
- 1287
- 1288
- 1289
- 1290
- 1291
- 1292
- 1293
- 1294
- 1295
- 1296
- 1297
- 1298
- 1299
- 1300
- 1301
- 1302
- 1303
- 1304
- 1305
- 1306
- 1307
- 1308
- 1309
- 1310
- 1311
- 1312
- 1313
- 1314
- 1315
- 1316
- 1317
- 1318
- 1319
- 1320
- 1321
- 1322
- 1323
- 1324
- 1325
- 1326
- 1327
- 1328
- 1329
- 1330
- 1331
- 1332
- 1333
- 1334
- 1335
- 1336
- 1337
- 1338
- 1339
- 1340
- 1341
- 1342
- 1343
- 1344
- 1345
- 1346
- 1347
- 1348
- 1349
- 1350
- 1351
- 1352
- 1353
- 1354
- 1355
- 1356
- 1357
- 1358
- 1359
- 1360
- 1361
- 1362
- 1363
- 1364
- 1365
- 1366
- 1367
- 1368
- 1369
- 1370
- 1371
- 1372
- 1373
- 1374
- 1375
- 1376
- 1377
- 1378
- 1379
- 1380
- 1381
- 1382
- 1383
- 1384
- 1385
- 1386
- 1387
- 1388
- 1389
- 1390
- 1391
- 1392
- 1393
- 1394
- 1395
- 1396
- 1397
- 1398
- 1399
- 1400
- 1401
- 1402
- 1403
- 1404
- 1405
- 1406
- 1407
- 1408
- 1409
- 1410
- 1411
- 1412
- 1413
- 1414
- 1415
- 1416
- 1417
- 1418
- 1419
- 1420
- 1421
- 1422
- 1423
- 1424
- 1425
- 1426
- 1427
- 1428
- 1429
- 1430
- 1431
- 1432
- 1433
- 1434
- 1435
- 1436
- 1437
- 1438
- 1439
- 1440
- 1441
- 1442
-

AQ27受容体の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記したAQ27受容体の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

5 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; ギャップを許す; マトリクス=BLOSUM62; フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

15 また、AQ27受容体の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1  
20 または2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは1~5個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、AQ27受容体の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基( $-COOH$ )、カルボキシレート( $-COO^-$ )、アミド( $-CONH_2$ )またはエステル( $-COOR$ )の何れであってもよい。

さらに、AQ27受容体の部分ペプチドには、前記したAQ27受容体と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あ

るいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

AQ27受容体またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

AQ27受容体をコードするDNAとしては、前述したAQ27受容体をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、AQ27受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：10、配列番号：12または配列番号：14で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：10、配列番号：12または配列番号：14で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列からなるAQ27受容体と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するAQ27受容体をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：10、配列番号：12または配列番号：14で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：10、配列番号：12または配列番号：14で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配

列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値＝10；ギャップを許す；フィルタリング＝ON；マッチスコア＝1；ミスマッチスコア＝－3）にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：9で表わされるアミノ酸配列からなるヒトAQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号：10で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：11で表わされるアミノ酸配列からなるラットAQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：13で表わされるアミノ酸配列からなるマウスAQ27受容体をコードするDNAとしては、配列番号：14で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

ヒトAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩は、WO 01/16316号公報に記載の方法に準じて製造することができる。

ラットまたはマウスAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩は、新規な蛋白質であり、WO 01/16316号公報に記載の方法に準じて製造す

ることができる。

(2-2) 本発明のペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法

5 本発明のペプチド、本発明のオリゴヌクレオチド、本発明の形質変換体または本発明の抗体は、本発明のペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング法に使用することができる。

すなわち、本発明は、

10 (i) 本発明のペプチドを発現し得る細胞または組織を、試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれの本発明のペプチドの発現量または本発明のペプチドをコードするmRNA量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドの発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のペプチドを発現し得る細胞または組織としては、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、  
15 サル等）の細胞（例えば、神経細胞、内分泌細胞、神経内分泌細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、肝細胞、脾細胞、メサングウム細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、樹状細胞）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、  
20 骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等、もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸（精巣）、  
25 卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等を用いても良い。その際、株化細胞、初代培養系を用いてもよい。また、前記した本発明の形質転換された形質変換体を使用してもよい。

本発明のペプチドを発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変

換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、前記の試験化合物の他、DNAライブラリーなどを用いることができる。

5 本発明のペプチドの発現量は抗体などを用いて免疫化学的方法などの公知の方法により測定することもできるし、本発明のペプチドをコードするmRNAをノーザンハイブリダイゼーション法、RT-PCRやTaqMan PCR法を用いて、公知の方法により測定することもできる。

10 mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法等に従って行なうことができる。

15 具体的には、本発明のペプチドをコードするmRNAの量の測定は、公知の方法に従って細胞から抽出したRNAと、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドとを接触させ、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチド結合したmRNAの量を測定することによって行われる。本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチド  
20 に結合したmRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein、FAM (PE Biosystems 社製)、JOE (PE Biosystems 社製)、TAMRA (PE Biosystems 社製)、ROX (PE Biosystems 社製)、Cy 5 (Amersham 社製)、Cy 3 (Amersham 社製)などの蛍光色素が用いられる。

25 また、mRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換した後、本発明のポリヌクレオチドもしくはその一部または本発明のアンチセンスポリヌクレオチドをプライマーとして用いるPCRによって、増幅されるcDNAの量を測定することによって行うことができる。

このように、本発明のペプチドをコードするmRNAの量を増加させる試験



化合物を、本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩として選択することができ、また本発明のペプチドをコードするmRNAの量を減少させる試験化合物を、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩として選択することができる。

5       さらに、本発明は、

(ii) 本発明のペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域またはエンハンサー領域の下流にレポーター遺伝子を連結した組換えDNAで形質転換した形質転換体を試験化合物の存在下および非存在下で培養した場合における、それぞれのレポーター活性を測定し、比較することを特徴とする当該プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、成長因子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、アルカリホスファターゼ、Green fluorescent protein (GFP)、 $\beta$ -ラクタマーゼなどが用いられる。

レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、蛋白質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物を本発明のペプチドのプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物またはその塩、すなわち本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩として選択できる。逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物を本発明のペプチドのプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物またはその塩、すなわち本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩として選択することができる。

25       試験化合物と試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものが使用される。

形質転換体の培養は、前記の本発明の形質転換体と同様にして行うことができる。

レポーター遺伝子のベクター構築やアッセイ法は公知の技術に従うことがで

きる（例えば、Molecular Biotechnology 13, 29-43, 1999）。

本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの作用を増強することができるので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、本発明のペプチドの発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

逆に、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のペプチドの発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、

過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、  
5 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは  
15 温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のペプチドの発現を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）  
20 においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のペプチドの発現を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kg当たり）に投与する場合、一日につき該化合物  
25 を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり換算した量を投与することができる。

これらの医薬は前記と同様に製剤化して、使用することができる。

（3）本発明のペプチドの定量および診断方法

本発明の抗体は、本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

- 5 (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、および

- (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供する。
- 10

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のペプチドのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

- 15 また、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

- 本発明の抗体を用いる本発明のペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。
- 20
- 25

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>Cなどが用いられる。上記酵素

としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチドのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、

競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し

- 5 (B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

- 10 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

- 15 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

- 20 これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

- 25 例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in

ENZYMOLOGY」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

5 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のペプチドを感度良く定量することができる。

10 さらに、本発明の抗体を用いて本発明のペプチドの濃度を定量することによって、本発明のペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のペプチドの濃度の増加が検出された場合には、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患としては、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などが挙げられる。

本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化

器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などが挙げられる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のペプチドの検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

#### （４）遺伝子診断剤

本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、  
10 ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

15 本発明のポリヌクレオチドまたは本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National  
20 Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合は、例えば、本発明のペプチドの機能不全に関連する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

25 また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

本発明のペプチドの発現低下に起因する疾患としては、例えば、低アルドス



テロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などが挙げられる。

5 本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患としては、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などが挙げられる。

（５）アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

15 本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のレセプター蛋白質または本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の機能を抑制することができるので、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

20 具体的には、本発明のDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は、本発明のペプチドの機能を阻害することができるので、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドは、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、25 ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスDNA）は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のDNAに対するアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該アンチセンスポリヌクレオチドを、上記した本発明のポリヌクレオチドの場合と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は低毒性であり、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

なお、該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進用の補助剤などの生理学的に認められる担体とともに、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを臓器（例、肝臓、肺、心臓、腎臓など）に局所投与する場合、成人（体重60kg）に対して、一日あたり約0.1～100mgである。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

本発明は、さらに

- ①本発明のペプチドをコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAとを含有する二重鎖RNA、
- ②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- ③本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有するリボザイム、

④前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。

これらの二重鎖RNA (RNAi ; RNA interference 法)、リボザイムなどは、上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)の発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチドまたはそれをコードする本発明のポリヌクレオチド(例、DNA)の機能を抑制することができるので、例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤(副腎皮質ホルモン分泌抑制剤)として有用である。さらに、これらの二重鎖RNA、リボザイムなどは、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、これらの二重鎖RNA、リボザイムなどは、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤(男性ホルモン分泌抑制剤)として有用である。さらに、これらの二重鎖RNA、リボザイムなどは、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌(例、手術不能乳癌)、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

二重鎖RNAは、公知の方法(例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法(例、TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221 頁, 2001 年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分(RNA断片)が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することがで

きる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のペプチドの過剰発現に起因する疾患などの予防・治療薬などの医薬として使用することができる。

具体的には、本発明のペプチドに対する抗体（例、中和抗体）は、本発明のペプチドの機能を阻害することができるので、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のペプチドに対する抗体（例、中和抗体）は、  
クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C  
RH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾ  
ール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、  
不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用であ  
る。

また、本発明のペプチドに対する抗体（例、中和抗体）は、安全で低毒性な  
男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン  
分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のペプチドに対する抗体は、  
例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、  
骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、  
乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、  
または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウ  
サギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非  
経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与  
ルートなどによっても異なるが、例えば、成人に使用する場合には、本発明の  
抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.  
1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度  
を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与す

るのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

5 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

15 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、  
20 生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、  
25 ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンフルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では  
5 5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### (7) 各種薬物の作用メカニズムの解明方法

10 AQ27受容体を用いることによって、各種薬物がAQ27受容体を介して薬理効果を発揮しているか否かを確認することができる。

すなわち、本発明は、

(1) AQ27受容体を用いることを特徴とする、(i) 副腎皮質ホルモン分泌促進薬、(ii) 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または  
15 慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療薬、(iii) 男性ホルモン分泌促進薬、(iv) 男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療薬、(v) 副腎皮質ホルモン分泌阻害薬（副腎皮質ホル  
20 モン分泌抑制薬）、(vi) クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療薬、(vii) 男性ホルモン分泌阻害薬（男性ホルモン分泌抑制薬）、また  
25 は(viii) 陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療薬がAQ27受容体に結合することを確認する方法、

(2) AQ27受容体を用いることを特徴とする、(i) 副腎皮質ホルモン

分泌促進薬、(ii) 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療薬、(iii) 男性ホルモン分泌促進薬、または(iv) 男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌(例、手術不能乳癌)、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療薬がAQ27受容体に対するアゴニストであることを確認する方法、

(3) AQ27受容体を用いることを特徴とする、(i) 副腎皮質ホルモン分泌阻害薬(副腎皮質ホルモン分泌抑制薬)、(ii) クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療薬、(iii) 男性ホルモン分泌阻害薬(男性ホルモン分泌抑制薬)、または(iv) 陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常(例、精子減少)、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状(例、食欲不振)、満月様顔貌などの予防・治療薬がAQ27受容体に対するアンタゴニストであることを確認する方法、

(4) 各薬をAQ27受容体に接触させた場合における、各薬とAQ27受容体との結合量を測定することを特徴とする上記(1)～(3)記載のスクリーニング方法を提供する。

この確認方法は、前記した本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法において、試験化合物に代えて、上記の薬物を使用することによって実施することができる。

また、本発明の確認方法用キットは、前記した本発明のペプチドとAQ27受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニング用キットにおいて、試験化合物に代えて、上記の薬物を含有するものである。

このように、本発明の確認方法を用いることによって、市販または開発途中の各種薬物がAQ27受容体を介して薬理効果を発揮していることを確認することができる。

## (8) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のペプチドをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

5 すなわち、本発明は、

- (i) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (ii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i)記載の動物、
- (iii) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(ii)記載の動物、および
- (iv) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において

10 て発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でか  
15 つ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培  
20 養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なか  
25 でも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラ



ット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

5 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

10 該異常DNAとしては、異常な本発明のペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のペプチドの機能を抑制するペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現せしめるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現せしめる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

25 本発明のペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス  
 (例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、  
 JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロ  
 モーター、②各種哺乳動物 (ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムス  
 5 ター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、イン  
 スリンII、ウロプラキシンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセ  
 リン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-ト  
 ランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1, K10およびK1  
 4、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ $\beta$   
 10 Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、  
 心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ (一般にTie  
 2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素 (Na, K-  
 ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびII  
 A、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原 (H-2  
 15 L)、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダー  
 ーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ およ  
 び $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロ  
 ブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイ  
 ドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレ  
 20 プロエンケファリンA、パソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。  
 なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、  
 ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) のプロモーター、ヒトおよびニワ  
 トリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーR  
 25 NAの転写を終結する配列 (一般にターミネーターと呼ばれる) を有している  
 ことが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの  
 配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネ  
 ーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

- 5      正常な本発明のペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補  
10      DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

- 15      該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

- 20      受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

- 25      本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、

作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

- 5       導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に  
10   本発明のペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能亢進症や、本発明のペプチドに関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明  
15   のペプチドの増加症状を有することから、本発明のペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述の  
20   プラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子  
25   孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配す

ることによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に  
5 本発明のペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本  
10 発明のペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ペプチドによる正常ペプチドの機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のペプチドの増加症状を有することから、本発明のペプチドまたはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

15 また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明の  
20 ペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスク  
25 リーニング、および

⑤本発明の変異ペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べるこ

とができ、また、本発明のペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### (9) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (i) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (ii) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(i)項記載の胚幹細胞、
- (iii) ネオマイシン耐性である第(i)項記載の胚幹細胞、
- (iv) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(i)項記載の胚幹細胞、
- (v) ゲッ歯動物がマウスである第(iv)項記載の胚幹細胞、
- (vi) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (vii) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の

DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(vi)項記載の非ヒト哺乳動物、

(viii) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(vi)項記載の非ヒト哺乳動物、

(ix) ゲッ歯動物がマウスである第(viii)項記載の非ヒト哺乳動物、および

- 5 (x) 第(vii)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの  
10 発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 15 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

- 20 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）  
25 を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセ

ンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の



性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C.

Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年]、本発明の ES 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のペプチドまたは本発明のレセプター蛋白質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 10 本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明の DNA と入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明の
- 15 DNA をノックアウトさせることができる。

- 本発明の DNA がノックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明の DNA が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8 細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明の DNA 座をもつ細胞と人為的に変異した本発明の DNA 座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。
- 25

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明の DNA 座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全

ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(9a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものが用いられる。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の機能（例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節活性）が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

- 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

また、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg

g、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(9b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法

10 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

15 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

20 試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

25 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ

ーガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のペプチドの発現する組織で、本発明のペプチドの代わりにβーガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5ーブロモー4ークロロー3ーインドリルーβーガラクトピラノシド (X-gal) のようなβーガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA / PBS溶液で洗浄することによって、βーガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該スクリーニング方法で得られた化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの発現を促進し、該ペプチドの機能を促進することができるので、例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、

肥満などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、本発明のDNAに対するプロモーター活  
5 性を促進する化合物またはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髄線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

一方、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその  
10 塩は、例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチ  
15 ゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌  
20 阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

25 さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造するこ



とができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5      該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度
- 10      を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg
- 15      gあたりに換算した量を投与することができる。

- 一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0
- 20      ～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは
- 25      約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに

対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

AQ27受容体に対する抗体、AQ27受容体をコードするDNAと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド（アンチセンスDNA）は、WO01/16313号に記載の方法に準じて製造することができる。

AQ27受容体、AQ27受容体をコードするDNA（以下、AQ27受容体DNAと略記する場合がある）、AQ27受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、AQ27受容体DNAに対するアンチセンスDNA（以下、本発明のアンチセンスDNAと略記する場合がある）は、以下の用途を有している。

(1) AQ27受容体の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

a) AQ27受容体またはb) AQ27受容体をコードするDNAを、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内においてAQ27受容体が減少しているために、リガンドである脂肪酸の生理作用が期待できない（AQ27受容体の欠乏症）患者がいる場合に、a) AQ27受容体を該患者に投与し該AQ27受容体の量を補充したり、b) (イ) AQ27受容体をコードするDNAを該患者に投与し発現さ

- せることによって、あるいは（口）対象となる細胞にA Q 2 7受容体をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるA Q 2 7受容体の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、A Q 2 7受容体をコードするDNAは、安全で低毒性なA Q 2 7受容体の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などとして有用である。

- 具体的には、A Q 2 7受容体またはA Q 2 7受容体DNAは、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、A Q 2 7受容体またはA Q 2 7受容体DNAは、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

- また、A Q 2 7受容体またはA Q 2 7受容体DNAは、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、A Q 2 7受容体またはA Q 2 7受容体DNAは、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

A Q 2 7受容体を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

- 一方、A Q 2 7受容体DNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、A Q 2 7受容体DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。A Q 2 7受容体DNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、a) A Q 2 7受容体またはb) A Q 2 7受容体DNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無

菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、

- a) A Q 2 7 受容体または b) A Q 2 7 受容体DNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填

される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5      A Q 2 7 受容体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、成人患者（体重 6 0 k g として）においては、一日につき約 0. 1 ~ 1 0 0 m g、好ましくは約 1. 0 ~ 5 0 m g、より好ましくは約 1. 0 ~ 2 0 m g である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、成人患者（体重 6 0 k g として）においては、一日につき約 0. 0 1 ~ 3 0 m g 程度、好ましくは約 0. 1 ~ 2 0 m g 程度、より好ましくは約 0. 1 ~ 1 0 m g 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 6 0 k g 当たりに換算した量を投与することができる。

- 15      A Q 2 7 受容体 DNA の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、成人患者（体重 6 0 k g として）においては、一日につき約 0. 1 ~ 1 0 0 m g、好ましくは約 1. 0 ~ 5 0 m g、より好ましくは約 1. 0 ~ 2 0 m g である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、成人患者（体重 6 0 k g として）においては、一日につき約 0. 0 1 ~ 3 0 m g 程度、好ましくは約 0. 1 ~ 2 0 m g 程度、より好ましくは約 0. 1 ~ 1 0 m g 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 6 0 k g 当たりに換算した量を投与することができる。

- 25      (2) 遺伝子診断剤

A Q 2 7 受容体 DNA およびアンチセンス DNA は、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における A Q 2 7 受容体またはその

部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

- 5      A Q 2 7 受容体DNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、
- 10      プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

- 15      例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりA Q 2 7 受容体の発現低下が検出された場合は、例えば、A Q 2 7 受容体の機能不全に関連する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションによりA Q 2 7 受容体の発現過多が検出された場合は、例えば、A Q 2 7 受容体の過剰発現に起因する疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 20      A Q 2 7 受容体の機能不全に関連する疾患としては、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などが挙げられる。

- 25      A Q 2 7 受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二

指腸潰瘍、過敏性腸症候、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などが挙げられる。

（３）ＡＱ２７受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有する医

## 5 薬

ＡＱ２７受容体ＤＮＡは、プローブとして用いることにより、ＡＱ２７受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、（ｉ）非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の  
10 の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ii）形質転換体等に含まれるＡＱ２７受容体のｍＲＮＡ量を測定することによる、ＡＱ２７受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

ＡＱ２７受容体のｍＲＮＡ量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

（ｉ）正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、  
15 ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、  
20 または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれるＡＱ２７受容体のｍＲＮＡは、例えば、通常の方法により細胞等からｍＲＮＡを抽出し、例えば、ＴaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行なうことにより解析することもできる。

25 （ii）ＡＱ２７受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれるＡＱ２７受容体のｍＲＮＡを同様にして定量、解析することができる。

ＡＱ２７受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング

は、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれるAQ27受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、
- 5 (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれるAQ27受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。
- 10

試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものがあげられる。

15

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現量を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、(イ) AQ27受容体の発現量を増加させることにより、AQ27受容体を介する細胞刺激活性を増強させる化合物、(ロ) AQ27受容体の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

20

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレ

25



イン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

上記スクリーニング方法で得られるA Q 2 7受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩は、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤として有用

5 である。

A Q 2 7受容体の発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、A Q 2 7受容体の発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、例えば、低アルドステロン症、  
10 低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

また、A Q 2 7受容体の発現量を増加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、A Q 2 7受容体の発現量を増  
15 加させ、細胞刺激活性を増強させる化合物は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嚔声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

一方、A Q 2 7受容体の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A  
20 Q 2 7受容体の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、  
25 原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、A Q 2 7受容体の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合

物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A Q 2 7 受容体の発現量を減少させ、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月  
5 経異常、多毛、色素沈着、嘎声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル  
10 剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和すること  
15 によって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのよ  
20 うな膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油な  
25 どのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、

例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、  
5 ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防  
10 止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

15 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、成人患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによ  
20 っても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、成人患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

#### 25 (4) A Q 2 7 受容体の定量法および診断方法

本発明の抗体は、A Q 2 7 受容体の特異的に認識することができるので、被検液中の A Q 2 7 受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化されたA Q 2 7受容体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたA Q 2 7受容体の割合を測定することを特徴とする被検液中のA Q 2 7受容体の定量法、および

- 5 (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のA Q 2 7受容体の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体がA Q 2 7受容体のN端部を  
10 認識する抗体で、他方の抗体がA Q 2 7受容体のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、A Q 2 7受容体に対するモノクローナル抗体を用いてA Q 2 7受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。  
15

本発明の抗体を用いるA Q 2 7受容体の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、A Q 2 7受容体量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算  
20 出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素とし  
25 ては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パ

一オキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常AQ27受容体あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のAQ27受容体量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるAQ27受容体の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、AQ27受容体の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、AQ27受容体のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いること

ができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を  
5 定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識  
10 化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果  
15 生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、  
20 特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてA Q 2 7 受容体の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、  
入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川  
25 栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol.

73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 5 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、AQ27受容体を感度良く定量することができる。

10 さらに、本発明の抗体を用いてAQ27受容体の濃度を定量することによって、AQ27受容体の濃度の減少が検出された場合、例えば、AQ27受容体の機能不全に関連する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、AQ27受容体の濃度の増加が検出された場合には、例えば、AQ 15 27受容体の過剰発現に起因する疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

AQ27受容体の機能不全に関連する疾患としては、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳などが挙げられる。 20

AQ27受容体の過剰発現に起因する疾患としては、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、 25 アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗔声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状

(例、食欲不振)、満月様顔貌などが挙げられる。

(5) 細胞膜におけるA Q 2 7受容体またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬

5 本発明の抗体は、A Q 2 7受容体の特異的に認識することができるので、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるA Q 2 7受容体を定量することによる、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量  
10 を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(ii) A Q 2 7受容体を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるA Q 2 7受容体を定量することによる、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる化合物またはその塩のスクリー  
15 グ方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる  
20 化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

(iv) A Q 2 7受容体を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる化合物またはその塩のスクリー  
25 ング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれるA Q 2 7受容体の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、



- ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定
- 5 時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX100<sup>TM</sup>、ツイーン20<sup>TM</sup> など）などを用い、
- 10 さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

- 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica 社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレス
- 15 などで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500～3000rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる
- 20 沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したAQ27受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 細胞膜画分に含まれるAQ27受容体は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウェスタンブロット解析などにより定量することができる。

- 25 かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、ウェスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

(ii) AQ27受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれるAQ27受容体を定量することができる。

細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を定量することにより行なうことができる。

- 15 細胞膜画分に含まれるA Q 2 7受容体の確認は具体的には以下のようにして行なう。

- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。
- 20 細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を確認することができる。

(iv) A Q 2 7受容体を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとるこ

とにより確認することもできる。

試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものがあげられる。

5 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、(イ)細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を増加させることにより、A Q 2 7受容体を介する細胞刺激活性(を増強させる化合物またはその塩、(ロ)細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩である。

10 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該化合物の塩としては、前記した本発明ペプチドの塩と同様のものが用いられる。

15 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤として有用である。

また、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、細胞膜にお  
20 けるA Q 2 7受容体の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

さらに、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を増加させることにより、細胞  
25 刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の

疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

- 一方、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として
- 5 有用である。さらに、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性
- 10 副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

- さらに、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）と
- 15 して有用である。さらに、細胞膜におけるA Q 2 7受容体の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嚔声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

- 20 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと
- 25 ともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範

囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖または5    サッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、10    例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

25    このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な

どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、成人患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、成人患者（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

10 (6) A Q 2 7 受容体に対する抗体を含有してなる医薬

A Q 2 7 受容体に対する抗体が中和活性を有する場合は、該 A Q 2 7 受容体の関与するシグナル伝達、例えば、該 A Q 2 7 受容体を介する細胞刺激活性を不活性化することができる。

したがって、A Q 2 7 受容体に対する抗体（例、中和抗体）は、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A Q 2 7 受容体に対する抗体（例、中和抗体）は、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H 産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、  
15 ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

さらに、A Q 2 7 受容体に対する抗体（例、中和抗体）は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、A Q 2 7 受容体に対する抗体（例、  
25 中和抗体）は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

(7) 本発明のアンチセンス DNA を含有してなる医薬

本発明のアンチセンスDNAは、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、本発明のアンチセンスDNAは、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、  
5 アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

また、本発明のアンチセンスDNAは、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として  
10 有用である。さらに、本発明のアンチセンスDNAは、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嚔声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単  
15 独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルに  
20 よって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞におけるAQ27受容体DNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

#### (8) AQ27受容体DNA導入動物の作製

25 本発明は、外来性のAQ27受容体DNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
[2] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]記載の動物、  
[3] ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第[2]記載の動物、および  
[4] 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物にお  
5 いて発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、AQ27受容体DNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精  
10 卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNA  
15 を転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることによりAQ27受容体DNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。  
20 なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。  
25 哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有しているAQ27受容体DNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出されたAQ27受容



体DNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元のAQ27受容体DNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも

5 含まれる。

該異常DNAとしては、異常なAQ27受容体を発現させるDNAを意味し、例えば、正常なAQ27受容体の機能を抑制するAQ27受容体を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。AQ27受容体DNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高いAQ27受容体DNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モル

10 モット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってAQ27受容体DNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

15

AQ27受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

20

25

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNA

のプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、  
 ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミ  
 ン、インスリンI I、ウロプラキニンI I、エラスターゼ、エリスロポエチン、  
 エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グル  
 5 タチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、  
 K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依  
 存蛋白質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカ  
 リフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシン  
 キナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3  
 10 リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メ  
 タロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、  
 MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水  
 酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （E  
 F-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および  
 15 2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、  
 H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、  
 トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシ  
 ンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現すること  
 が可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$   
 20 （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモータ  
 ーなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー  
 RNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有して  
 いることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各D  
 25 NAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40  
 ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAの  
 スプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一

部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常なA Q 2 7受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なA Q 2 7受容体の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け

継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するよう  
5 うに繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的にAQ27受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用  
10 いて、AQ27受容体の機能亢進症や、AQ27受容体が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離したAQ27受容体の増加症状を有することから、AQ27受容体に関連する疾患に  
15 対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製  
20 することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常  
25 DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するよう

に繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的にAQ27受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、AQ27受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常AQ27受容体による正常AQ27受容体の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離したAQ27受容体の増加症状を有することから、AQ27受容体またはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類のAQ27受容体DNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②AQ27受容体DNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたAQ27受容体組織を分析することによる、AQ27受容体により特異的に発現あるいは活性化するAQ27受容体との関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異AQ27受容体を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、AQ27受容体DNA転移動物を用いて、AQ27受容体の機能

不活性型不応症などを含む、A Q 2 7 受容体に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、A Q 2 7 受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

- 5       また、A Q 2 7 受容体DNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、A Q 2 7 受容体産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べる  
10       ことなどができ、A Q 2 7 受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

- さらに、A Q 2 7 受容体DNA転移動物を用いて、A Q 2 7 受容体の機能不活性型不応症を含む、A Q 2 7 受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患  
15       治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、A Q 2 7 受容体DNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、A Q 2 7 受容体に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### (9) ノックアウト動物

- 20       本発明は、A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞およびA Q 2 7 受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- [1] A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、  
[2] 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第[1]項記載の胚幹細胞、  
25       [3] ネオマイシン耐性である第[1]項記載の胚幹細胞、  
[4] 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第[1]項記載の胚幹細胞、  
[5] ゲッ歯動物がマウスである第[4]項記載の胚幹細胞、

〔6〕 A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

〔7〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がA Q 2 7 受容体DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、

〔8〕 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、  
〔9〕 ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および  
〔10〕 第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするA Q 2 7 受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有するA Q 2 7 受容体DNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしているA Q 2 7 受容体の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的にA Q 2 7 受容体の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、E S細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

A Q 2 7 受容体DNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、A Q 2 7 受容体DNA不活性化E S細胞または本発明のノックアウトE S細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有

するA Q 2 7受容体DNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはl a c-Z ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子)、c a t (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を  
5 挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同  
10 組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたE S細胞についてA Q 2 7受容体DNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用したA Q 2 7受容体DNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明の  
15 ノックアウトE S細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等によりA Q 2 7受容体DNAを不活化させる元のE S細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのE S細胞の場合、現在、一般的には1 2 9系のE S細胞が使用  
20 されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなE S細胞を取得するなどの目的で例えば、C 5 7 B L / 6 マウスやC 5 7 B L / 6 の採卵数の少なさをD B A / 2 との交雑により改善したB D F<sub>1</sub>マウス(C 5 7 B L / 6 とD B A / 2 とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。B D F<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多い、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C 5 7 B L / 6 マウスを背景  
25 に持つので、これを用いて得られたE S細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C 5 7 B L / 6 マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC 5 7 B L / 6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。



また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

5 また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

15 また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

20 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF( $1 \sim 10000 \text{ U/ml}$ )存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約 $37^\circ\text{C}$ で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液  
25 (通常 $0.001 \sim 0.5\%$ トリプシン/ $0.1 \sim 5 \text{ mM}$  EDTA、好ましくは約 $0.1\%$ トリプシン/ $1 \text{ mM}$  EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代

は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋  
5    などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans及び  
M. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin  
プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・  
ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年;  
10    T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エク  
スペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES  
細胞を分化させて得られるAQ27受容体DNA発現不全細胞は、インビトロ  
におけるAQ27受容体またはAQ27受容体の細胞生物学的検討において有用である。

AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を  
15    公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常  
動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のように  
して作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞  
20    に導入し、導入によりターゲッティングベクターのAQ27受容体DNA  
が不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞ま  
たはマウス卵細胞の染色体上のAQ27受容体DNAと入れ換わる相同組換  
えをさせることにより、AQ27受容体DNAをノックアウトさせることが  
できる。

25    AQ27受容体DNAがノックアウトされた細胞は、AQ27受容体DNA  
上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼー  
ション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッ  
ティングベクターに使用したマウス由来のAQ27受容体DNA以外の近傍領

域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、A Q 2 7 受容体DNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、  
5 作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常なA Q 2 7 受容体DNA座をもつ細胞と人為的に変異したA Q 2 7 受容体DNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異したA Q 2 7 受容体DNA座をもつ  
10 場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えたA Q 2 7 受容体DNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、A Q 2 7 受容体のヘテロ発現不全個体であり、A Q 2 7 受容体のヘテロ発現不全個体同志を  
15 交配し、それらの産仔からA Q 2 7 受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これら  
20 のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えによりA Q 2 7 受容体DNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにしてA Q 2 7 受容体DNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

25 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート

複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

AQ27受容体DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、AQ27受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、AQ27受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(9a) AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法

AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することの特徴とする、AQ27受容体DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられるAQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものが用いられる。

具体的には、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈

注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 5        該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の機能（例えば、副腎皮質ホルモン分泌促進活性）が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩として選択することができる。

- 10       該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

- 15       また、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 25       該スクリーニング方法で得られた化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、

硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

- 5       該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記したAQ27受容体とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、  
10       ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人患者(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より  
15       好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常、成人患者(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静  
20       脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(9b) AQ27受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニング方法

- 本発明は、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物  
25       を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするAQ27受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

          上記スクリーニング方法において、AQ27受容体DNA発現不全非ヒト

哺乳動物としては、前記したA Q 2 7受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、A Q 2 7受容体DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がA Q 2 7受容体DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

- 5      試験化合物および試験化合物が形成してもよい塩としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（l a c Z）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

- 10      A Q 2 7受容体DNAをレポーター遺伝子で置換されたA Q 2 7受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子がA Q 2 7受容体DNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

- 15      例えば、A Q 2 7受容体をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（l a c Z）で置換している場合、本来、A Q 2 7受容体の発現する組織で、A Q 2 7受容体の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド（X-g a l）のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの

- 20      基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便にA Q 2 7受容体の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、A Q 2 7受容体欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（P B S）で洗浄後、X-g a lを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1 m

- 25      M E D T A / P B S 溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、l a c ZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記し

た試験化合物から選ばれた化合物またはその塩であり、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該スクリーニング方法で得られた化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な副腎皮質ホルモン分泌調節剤として有用である。

AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現を促進し、AQ27受容体の機能を促進することができるので、例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満などの予防・治療剤として有用である。

さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌促進剤として有用である。さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、男性性腺機能不全、造精機能障害に伴う男子不妊症、再生不良性貧血、骨髓線維症、腎性貧血、末期女性性器癌の疼痛緩和、乳癌（例、手術不能乳癌）、乳腺症、乳腺腫瘍、女性化乳房などの予防・治療剤として有用である。



一方、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、AQ27受容体の発現を阻害し、AQ27受容体の機能を阻害することができるので、例えば、副腎皮質ホルモン分泌調節剤、好ましくは副腎皮質ホルモン分泌阻害剤（副腎皮質ホルモン分泌抑制剤）として有用である。

- 5 さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍、過敏性腸症候群などの予防・治療剤として有用である。

- 10 さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、安全で低毒性な男性ホルモン分泌調節剤、好ましくは男性ホルモン分泌阻害剤（男性ホルモン分泌抑制剤）として有用である。さらに、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、陰茎肥大、精巣萎縮、精巣機能異常（例、精子減少）、月経異常、多毛、色素沈着、嗄声、過敏症、坐瘡、悪心、嘔吐、消化器系症状（例、食欲不振）、満月様顔貌などの予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 20 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記したAQ27受容体またはその塩とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 25 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、AQ27受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人患者

(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、A Q 2 7受容体DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常、成人患者(体重60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、A Q 2 7受容体DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、A Q 2 7受容体DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、A Q 2 7受容体DNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、A Q 2 7受容体のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々の蛋白質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのA Q 2 7受容体を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、A Q 2 7受容体そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- DNA : デオキシリボ核酸  
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸  
A : アデニン  
T : チミン  
5 G : グアニン  
C : シトシン  
I : イノシン  
R : アデニン (A) またはグアニン (G)  
Y : チミン (T) またはシトシン (C)  
10 M : アデニン (A) またはシトシン (C)  
K : グアニン (G) またはチミン (T)  
S : グアニン (G) またはシトシン (C)  
W : アデニン (A) またはチミン (T)  
B : グアニン (G) 、グアニン (G) またはチミン (T)  
15 D : アデニン (A) 、グアニン (G) またはチミン (T)  
V : アデニン (A) 、グアニン (G) またはシトシン (C)  
N : アデニン (A) 、グアニン (G) 、シトシン (C) もしくはチミン (T)  
または不明もしくは他の塩基  
RNA : リボ核酸  
20 mRNA : メッセンジャーリボ核酸  
dATP : デオキシアデノシン三リン酸  
dTTP : デオキシチミジン三リン酸  
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸  
dCTP : デオキシシチジン三リン酸  
25 ATP : アデノシン三リン酸  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸  
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム  
BHA : ベンズヒドリルアミン  
pMBHA : p-メチルベンズヒドリルアミン

	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	B z l	: ベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
5	DCM	: ジクロロメタン
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	T F A	: トリフルオロ酢酸
	D I E A	: ジイソプロピルエチルアミン
10	G l y 又は G	: グリシン
	A l a 又は A	: アラニン
	V a l 又は V	: バリン
	L e u 又は L	: ロイシン
	I l e 又は I	: イソロイシン
15	S e r 又は S	: セリン
	T h r 又は T	: スレオニン
	C y s 又は C	: システイン
	M e t 又は M	: メチオニン
	G l u 又は E	: グルタミン酸
20	A s p 又は D	: アスパラギン酸
	L y s 又は K	: リジン
	A r g 又は R	: アルギニン
	H i s 又は H	: ヒスチジン
	P h e 又は F	: フェニルアラニン
25	T y r 又は Y	: チロシン
	T r p 又は W	: トリプトファン
	P r o 又は P	: プロリン
	A s n 又は N	: アスパラギン
	G l n 又は Q	: グルタミン

- p G l u 又は P y r : ピログルタミン酸  
 T y r ( I ) : 3-ヨードチロシン  
 D M F : N, N-ジメチルホルムアミド  
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 5 T r t : トリチル  
 P b f : 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル  
 C l t : 2-クロロトリチル  
 B u t : t-ブチル  
 10 M e t ( O ) : メチオニンスルフォキシド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

ヒト型前駆体蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2]

- 15 ヒト型前駆体蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：3]

ラット型前駆体蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4]

ラット型前駆体蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

- 20 [配列番号：5]

マウス型前駆体蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6]

マウス型前駆体蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：7]

- 25 ウシ前駆体蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：8]

ウシ前駆体蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

ヒトAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

ヒトAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

ラットAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：12〕

ラットAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

マウスAQ27受容体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

10 マウスAQ27受容体をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

参考例1でヒト型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：16〕

15 参考例1でヒト型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：17〕

参考例2でラット型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

20 〔配列番号：18〕

参考例2でラット型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：19〕

25 参考例5でマウス型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：20〕

参考例5でマウス型前駆体蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：21〕

参考例 16 でウシ型前駆体蛋白質をコードする cDNA のスクリーニングに  
使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：22〕

5 参考例 16 でウシ型前駆体蛋白質をコードする cDNA のスクリーニングに  
使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：23〕

参考例 17 でラット AQ27 をコードする cDNA のスクリーニングに使用  
した合成 DNA を示す。

〔配列番号：24〕

10 参考例 17 でラット AQ27 をコードする cDNA のスクリーニングに使用  
した合成 DNA を示す。

〔配列番号：25〕

参考例 17 でマウス AQ27 をコードする cDNA のスクリーニングに使用  
した合成 DNA を示す。

15 〔配列番号：26〕

参考例 17 でマウス AQ27 をコードする cDNA のスクリーニングに使用  
した合成 DNA を示す。

〔配列番号：27〕

参考例 19 で使用したプライマーの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：28〕

参考例 19 で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

参考例 19 で使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

25 参考例 20 で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

参考例 20 で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

参考例 20 で使用したプローブの塩基配列を示す。

[配列番号：33]

参考例21で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：34]

参考例21で使用したプライマーの塩基配列を示す。

5 [配列番号：35]

参考例21で使用したプローブの塩基配列を示す。

[配列番号：36]

参考例21で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：37]

10 参考例21で使用したプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：38]

参考例21で使用したプローブの塩基配列を示す。

後述の参考例1で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pTAhFRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7903として、2002年2月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16752として寄託されている。

20 後述の参考例2で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pTA<sub>r</sub>FRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7905として、2002年2月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16754として寄託されている。

25 後述の参考例5で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pTA<sub>m</sub>FRF-1は、2002年2月18日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産



業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7904として、2002年2月6日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16753として寄託されている。

- 5 後述の参考例16で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pTABFRF-1は、2002年8月21日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8162として寄託されている。

- 10 後述の参考例17で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pCR2.1-ratAQ27は、2002年8月21日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8163として寄託されている。

- 15 後述の参考例18で得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pCR2.1-mouseAQ27は、2002年8月21日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8164として寄託されている。

20 実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

参考例1 ヒトcDNAからのPCR法による新規分泌蛋白質遺伝子の取得

- 25 クローンテック社より購入したHuman Universal cDNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

RFF2 5'-ATGGTAAGGCCTTACCCCTGATCTAC-3'（配列番号：15）

RFR1 5'-CAAATCCTTCCAAGGCGTCCTGGCCCT-3'（配列番号：16）

PCRの反応液はcDNA溶液1microl、0.5microl RF

F2 (10μM)、0.5μl RFR1 (10μM)、2.5μl 添付の10x反応液、2.5μl dNTP (10 mM)、0.25μl ExTaq (タカラ)、17.75μl 大塚蒸留水を加えて合計25μlにした。反応液を、  
5 ThermalCycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・30秒のサイクルを40回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約400bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQiagen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図1で示す配列がえられた。図1のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図12に示すものであった。また、図2のアミノ酸配列の1から18番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。

さらに、生成するペプチドとして、

- (1) C末端がアミド化された、図2 (配列番号：1) に示されたアミノ酸配列の第26番目～88番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、  
15
- (2) C末端がアミド化された、図2 (配列番号：1) に示されたアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- (3) C末端がアミド化された、図2 (配列番号：1) に示されたアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列を含有するペプチド、  
20
- (4) C末端がアミド化された、図2 (配列番号：1) に示されたアミノ酸配列の第127番目～133番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが考えられる。

次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTAhFRF-1 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTAhFRF-1 をプラスミド抽出機 (クラボウ社) を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図11と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

参考例2 ラットゲノムDNAからのPCR法によるリガンド候補遺伝子の取

得

クローンテック社より購入したRat Genomic DNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

F1 5'-CCTCCTCTCTCTCCCTCCTCTGCTCAG-3' (配列番号: 17)

5 R1 5'-ACGGGGCAGAGTCCACGCAGGCCCTCA-3' (配列番号: 18)

PCRの反応液はDNA溶液1microl、0.5microl F1 (10microm)、0.5microl R1 (10microm)、2.5microl 添付の10x反応液、2.5microl dNTP (10mM)、0.25microl ExTaq (タカラ)、17.75microl大塚  
10 蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、Thermal Cycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約400bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiagen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図  
15 3で示す配列がえられた。図3のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図14に示すものであった。また図4のアミノ酸配列の1から17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。

またヒト型とラット型のアミノ酸配列を比較したところ図5のようになり、  
20 特にC末端のRFアミドモチーフの配列 (Arg Phe Gly Arg) が保存されていた。さらに、生成するペプチドとしてC末端がアミド化されたGly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 27の第116番目~122番目)、Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 27の第115番目~122番目) 等が予想  
25 された。

次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて大腸菌JM109にサブクローニングし、大腸菌JM109/pTARFRF-1を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpTARFRF-1をプラスミド抽出機 (クラボウ社) を用い

て抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図3と同じラット型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

### 参考例3

- (1) Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第127番目～133番目) および Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第80番目～88番目) の合成

Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第127番目～133番目) および Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第80番目～88番目) を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

- (2) Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目～133番目) の合成

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第124番目～133番目) を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

- 参考例4 新規ヒト型ペプチド: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第127番目～133番目) および Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第80番目～88番目) のAQ27受容体およびOT7T022受容体を一過性に発現させたHEK293細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

- 参考例3で合成した新規ヒト型ペプチドによるAQ27受容体 (配列番号: 31) およびヒトOT7T022受容体 (配列番号: 35) に特異的な刺激活性の検出は、cAMPレスポンスエレメント (CRE) プロモーターの発現誘導によって産生されるレポーター遺伝子産物 (ルシフェラーゼ) の発現量を指標に行った。

- HEK293細胞を増殖培地 (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GibcoBRL) に10%ウシ胎児血清 (GibcoBRL) を添加したもの) に懸濁し、1x10<sup>5</sup> cells/well の濃度にてコラーゲンでコートされたBlackwell 96ウェルプレート (ベクトンディッキンソン社) にまいた。37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した後、レポーター遺伝子を含むプラスミドであるpCRE-Luc (Clontech) と同時に、公知の方法により動物細胞

での発現用ベクター pAKKO-111H (Biochem. Biophys. Acta, Hinuma, S. et al., 1219, 251-259, 1994 記載の pAKKO-1. 11H と同一のプラスミドベクター) に AQ27 遺伝子 (配列番号: 32) およびヒト OT7T022 遺伝子 (配列番号: 36) を挿入して作製した発現ベクタープラスミド、  
5 または、AQ27 遺伝子を含まないもとの pAKKO-111H を用いて細胞のトランスフェクションを以下のとおりに行った。

OPTI-MEM-I (GibcoBRL) と Lipofectamine™ 2000 Reagent (GibcoBRL) を 24:1 にて混合することにより、リポフェクトアミン希釈液を調製した。また、OPTI-MEM-I、AQ27 発現ベクタープラスミドまたはもとのベクタープラスミド (240 ng/μl) およ  
10 び pCRE-Luc (240 ng/μl) を 24:0.9:0.1 にて混合することにより DNA 希釈液を調製した。リポフェクトアミン希釈液と DNA 希釈液を等量混合し、20 分間室温で静置することにより DNA とリポフェクトアミンの複合体を形成させた後、上記の HEK293 細胞を培養したプレート  
15 に 25 μl 添加し、さらに 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した。

トランスフェクトした HEK293 細胞をアッセイ用培地 (DMEM に 0.1% ウシ血清アルブミンを添加したもの) にて洗浄した後、アッセイ用培地にて希釈した参考例 3 で合成した新規ヒト型ペプチドを 10、1、0.1 μM と  
なるよう添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間培養した。培養上清を捨て  
20 て、ルシフェラーゼ活性測定用の基質であるピッカジーン LT2.0 (東洋インキ製造株式会社) を 50 μl 添加し、プレートリーダー (ARVO s x マルチラベルカウンター、Wallac 社) を用いてルシフェラーゼの発光量を測定した。

その結果、2 種類の新規ヒト型ペプチドはいずれも AQ27 受容体に対し  
25 フォルスコリン (FSK) 添加で刺激したルシフェラーゼ活性を濃度依存的に増強する反応として検出された。一方、ヒト OT7T022 受容体に対しては FSK 添加で刺激したルシフェラーゼ活性を抑制する反応として検出された。これらの反応は受容体を導入していない空のベクター pAKKO-111H を発現させた細胞では検出されなかった。したがって、2 種類の新規ヒト型ペプチドは AQ27 受容体特異的にルシフェラーゼ活性の増強を引き起こしたことが確認

された（図6、図7）。

参考例5 マウスゲノムDNAからのPCR法によるリガンド候補遺伝子の取得

クローンテック社より購入したMouse Genomic DNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCR による増幅を行った。

F2 5'-ATGAGGGGCTTCCGGCCTTTGCTTTCC-3'（配列番号：19）

R2 5'-TCACCGTCCAAAGCGGAAGCTGAAGCC-3'（配列番号：20）

PCRの反応液はDNA溶液1microl、0.5microl F2（10microm）、0.5microl R2（10microm）、2.5microl添付の10x反応液、2.5microl dNTP（10mM）、0.25microl ExTaq（タカラ）、17.75microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、Thermal Cycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約400bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiagen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図8で示す配列がえられた。図8のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図9に示すものであった。また、図9のアミノ酸配列の1～17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さらに生成するペプチドとしてC末端がアミド化された Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：5の第116番目～122番目）、Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe-NH<sub>2</sub>（配列番号：5の第115番目～122番目）等が予想された。

次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pTAmFRF-1 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pTAmFRF-1 をプラスミド抽出機（クラボウ社）を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図8と同じマウス型分泌蛋白質遺伝子 cDNA であることを確認した。

参考例6 新規ヒト型ペプチド：

Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 1 2 4 番目 ~ 1 3 3 番目) の A Q 2 7 受容体を一過性に発現させた H E K 2 9 3 細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

参考例 4 と同様の方法で新規ヒト型ペプチド:

- 5 Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 1 2 4 番目 ~ 1 3 3 番目) の (1) A Q 2 7 受容体を一過性に発現させていない H E K 2 9 3 細胞 (図 1 0) および (2) A Q 2 7 受容体を一過性に発現させた H E K 2 9 3 細胞 (図 1 1) に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、新規ペプチドは A Q 2 7 に対してはルシフェラーゼ活性の上昇作用を (図 1 1) を引き起こした。
- 10

参考例 7 ヒト A Q 2 7 発現 CHO 細胞における c A M P 産生抑制活性の検出

自体公知の方法で樹立した A Q 2 7 発現 CHO 細胞 (図 1 2) およびコントロールとなる mock CHO 細胞 (図 1 3) を、 $4 \times 10^4$ /well の濃度にて 9 6 ウェルプレート (ベクトンデッキンソン) に撒いて、一晚培養した。

- 15 アッセイ用バッファーには H a n k s ' B a l a n c e d S a l t S o l u t i o n に 0. 1 % ウシ血清アルブミンおよび 0. 2 m M 3 - I s o b u t y l - 1 - m e t h y l x a n t h i n e を添加したものを用いた。アッセイ用バッファーで細胞を 2 回洗浄し、3 7 ° C で 3 0 分間プレインキュベーションした。再度細胞を 2 回洗浄したのちにアッセイ用バッファーで調製したサンプルを添加し、3 7 ° C で 3 0 分間インキュベーションした。c A M P 産生抑制活性を評価するため、c A M P 産生上昇を促進するホルスコリン (F S K、和光純薬) 2  $\mu$  M のみのサンプルと同濃度の F S K と  $10^{-7}$  ~  $10^{-5}$  M の新規ヒト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 1 2 4 番目 ~ 1 3 3 番目) を含むサンプルで比較した。細胞の上清を捨てて、
- 20
- 25 c A M P S c r e e n S y s t e m (アプライド バイオシステムズ) によって細胞内の c A M P 産生量を測定した。その結果、図 1 2 に示す通り、A Q 2 7 発現 CHO においてのみ、F S K で誘導された c A M P 産生がペプチドの添加によって抑制された。

参考例 8 A Q 2 7 発現 CHO 細胞における細胞内カルシウムイオン遊離促進

### 活性の検出

自体公知の方法で樹立したAQ27発現CHO細胞を96-wellの黒色培養プレート(Costar社)に $4 \times 10^4$  cells/wellの細胞数で播種し、一晚培養した。Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) に20mMのHEPES (pH7.4, 同仁化学研究所)、2.5mM probenecid (Sigma社)を添加したものをアッセイバッファーとして用意した。細胞の培地を除去し、アッセイバッファーに4  $\mu$ MのFluo-3-AM(Dojindo社)および0.04% Pluronic acid (Molecular Probes社)を添加したものを加え、37℃で1時間インキュベーションした。細胞をアッセイバッファーで洗浄して過剰なFluo-3を除去し、FLIPR (モレキュラーデバイス社)にセットした。アッセイバッファーに溶解した検体も同じくFLIPRにセットした後、内蔵のマニピレーターによってサンプルを細胞に添加し、励起光の照射によって発生する細胞内カルシウムイオン濃度に依存した蛍光量の変化を測定した。その結果、サンプル無添加(○)に対し、新規ヒト型ペプチド: Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第124番目~133番目; RKKGGFSFRF-NH<sub>2</sub>) および新規ヒト型ペプチド: Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第127番目~133番目; GGFSFRF-NH<sub>2</sub>) について、10  $\mu$ M (▲)、1  $\mu$ M (□) ではそれぞれ図14および図15に示すような反応が検出され、それぞれのペプチドによってAQ27発現CHO細胞の細胞内カルシウムイオン遊離促進活性が検出された。

### 参考例9

#### (1)

25 Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第108番目~133番目; T1-F26-NH<sub>2</sub>) の合成

T1-F26-NH<sub>2</sub>を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

#### (2)



Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 91 番目 ~ 133 番目; Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub>) の合成

5 Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub> を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

(3) Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 61 番目 ~ 86 番目; A 1-F 28-NH<sub>2</sub>) の合成

A 1-F 28-NH<sub>2</sub> を自体公知のペプチド合成法を用いて製造した。

10 参考例 10 新規ヒト型ペプチド:

Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 108 番目 ~ 133 番目; T 1-F 26-NH<sub>2</sub>) および

15 Pyr-Asp-Glu-Gly-Ser-Glu-Ala-Thr-Gly-Phe-Leu-Pro-Ala-Ala-Gly-Glu-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Leu-Gly-Asn-Leu-Ala-Glu-Glu-Leu-Asn-Gly-Tyr-Ser-Arg-Lys-Lys-Gly-Gly-Phe-Ser-Phe Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1 の第 91 番目 ~ 133 番目; Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub>) のヒト AQ 27 受容体を一過性に発現させた HEK 293 細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

20 参考例 4 と同様の方法を用いて、参考例 9 で合成した新規ペプチド T 1-F 26-NH<sub>2</sub> および Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub> の (1) AQ 27 受容体を一過性に発現させていない HEK 293 細胞 (図 16)、(2) AQ 27 受容体を一過性に発現させた HEK 293 細胞 (図 17) に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、それぞれのペプチドによって AQ 27 受容体を発現させた HEK 293 細胞においてルシフェラーゼ活性の上昇が検出  
25 された。

参考例 11 新規ヒト型ペプチド: Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub> による AQ 27 発現 CHO 細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検出

参考例 8 と同様の方法により、Pyr 1-F 43-NH<sub>2</sub> による AQ 27 発現 CHO 細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検討を行った。その結

果、図18に示す通り  $10^{-8}$ M以上の新規ペプチドPy r 1 - F 4 3 - NH<sub>2</sub>の添加によって、CHO-AQ 2 7特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。一方、図19に示す通り、コントロールとなるm o c k CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ 2 7のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

参考例12 新規ヒト型ペプチド: Py r 1 - F 4 3 - NH<sub>2</sub>によるAQ 2 7発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性

参考例7の方法と同様の方法により、新規ペプチドPy r 1 - F 4 3 - NH<sub>2</sub>によるAQ 2 7発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性を検出した。その結果、図20に示す通り、AQ 2 7発現CHO特異的に、FSKで誘導されたcAMP産生が新規ペプチドPy r 1 - F 4 3 - NH<sub>2</sub>の添加によって抑制された。一方、図21に示す通り、コントロールとなるm o c k CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ 2 7のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

15 参考例13 新規ヒト型ペプチド:

Ala-Ser-Gln-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Ile-Ala-Arg-Gly-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Arg-Glu-His-Ala-Gly-Cys-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (配列番号: 1の第61番目~86番目; A 1 - F 2 8 - NH<sub>2</sub>) のヒトAQ 2 7受容体を一過性に発現させたHEK 2 9 3細胞に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性

20 参考例4と同様の方法を用いて、参考例9で合成した新規ヒト型ペプチド: A 1 - F 2 8 - NH<sub>2</sub>の(1)AQ 2 7受容体を一過性に発現させていないHEK 2 9 3細胞(図22)、(2)AQ 2 7受容体を一過性に発現させたHEK 2 9 3細胞(図23)に対するレポーター遺伝子発現量の上昇活性を測定した。その結果、A 1 - F 2 8 - NH<sub>2</sub>によってAQ 2 7受容体を発現させたHEK 2 9 3細胞においてルシフェラーゼ活性の上昇が検出された。

25 参考例14 新規ヒト型ペプチド: A 1 - F 2 8 - NH<sub>2</sub>によるAQ 2 7発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検出

参考例8と同様の方法により、新規ペプチドA 1 - F 2 8 - NH<sub>2</sub>によるAQ 2 7発現CHO細胞特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性の検討を行った。

その結果、図24に示す通り  $10^{-6}$ M以上の新規ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>の添加によって、CHO-AQ27特異的な細胞内カルシウムイオン動員活性が認められた。一方、図25に示す通り、コントロールとなるmock CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

参考例15 新規ヒト型ペプチド：A1-F28-NH<sub>2</sub>によるAQ27発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性

参考例7の方法と同様の方法により、新規ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>によるAQ27発現CHO細胞特異的なcAMP産生抑制活性を検出した。その結果、図26に示す通り、AQ27発現CHO特異的に、FSKで誘導されたcAMP産生が  $10^{-6}$ M以上の新規ペプチドA1-F28-NH<sub>2</sub>の添加によって抑制された。一方、図27に示す通り、コントロールとなるmock CHO細胞においては活性が認められず、同ペプチドがAQ27のリガンドとして特異的なアゴニスト活性を示すことが確認された。

参考例16 ウシゲノムDNAからのPCR法による新規分泌蛋白質I遺伝子の取得

クローンテック社より購入したBovine Genomic DNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

bF 5'- ATGCGGAGCCCTTACTCCCTGCCCTAC -3' (配列番号：21)

bR 5'- TCACCGCCGACCGAAGCGGAAGCTGAA -3' (配列番号：22)

PCRの反応液はDNA溶液1microl、0.5microl bF (10microm)、0.5microl bR (10microm)、2.5microl添付の10x反応液、2.5microl dNTP (10mM)、0.25microl ExTaq (タカラ)、17.75microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、Thermal Cycler 9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・30秒のサイクルを30回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約400bpのP

CR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuiagen PCR purification Kitを用いて精製し、直接配列決定を行ったところ図28で示す配列がえられた。図28のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図29に示すものであった。また図29のアミノ酸配列の1～17番目のアミノ酸配列は分泌シグナルと予想された。さらに生成するペプチドとして、C末端がアミド化された図29のアミノ酸配列の第124番目～131番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたはC末端がアミド化された図29のアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列を有するペプチド等が予想される。

- 10 次に、ゲルから回収したPCR産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて大腸菌JM109にサブクローニングし、大腸菌JM109/pTABFRF-1。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpTABFRF-1をプラスミド抽出機 (クラボウ社) を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が図28と同じヒト型分泌蛋白質遺伝子cDNAであることを確認した。

参考例17 ラット副腎cDNAからのPCR法によるAQ27受容体遺伝子の取得

- 20 ラット副腎のpolyA+RNA1μgからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素 (GIBCO BRL社) を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、cDNAを得た。以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

F1 5'-CGTCGACGCATGCAGGCGCTCAACATCACCGCG-3' (配列番号: 23)

R2 5'-CACTAGTTTACAGTTCATGGCCACTACCAAAAGTA-3' (配列番号: 24)

- 25 PCRの反応液はcDNA溶液1μl、0.5μl F1 (10μM)、0.5μl R1 (10μM)、5μl添付の5x反応液、2.5μl Gcmelt、2.5μl dNTP (10mM)、0.5μl Advantage Gcmelt polymerase Mix (クローンテック)、12.5μl大塚蒸留水を加えて合計25μlにした。反応液

を、ThermalCycler9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、61℃・20秒、72℃・120秒のサイクルを35回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約1300bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuia  
5 gen PCR purification Kitを用いて精製し、TAクローニングキット（Invitrogen社）を用いて大腸菌JM109にサブクローニングし、大腸菌JM109/pCR2.1-ratAQ27を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドpCR2.1-ratAQ27をQuia  
10 gen QIAwell 8 Ultra Plasmid Kitを用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、図30で示す配列がえられた。図30のDNA配列から予測されるアミノ酸配列は図31に示すものであった。また、ヒト型およびマウス型AQ27との相同性は図32に示すとおりであり、ラット型AQ27受容体であることが確認された。

参考例18 マウス脳cDNAからのPCR法によるAQ27受容体遺伝子の取得  
15

クローンテック マウスMTC Panelの脳cDNAを鋳型として、以下の2種類の合成DNAを用いて、PCRによる増幅を行った。

F1 5'-CGTCGACGCATGCAGGCGCTCAACATCACCGCG-3' (配列番号：25)

R2 5'-CATCGATATTACAGTTCATGTCCACTGCCGAAAGTA-3' (配列番号：26)

20 PCRの反応液はcDNA溶液1microl、0.5microl F1 (10microm)、0.5microl R1 (10microm)、5microl添付の5x反応液、2.5microl Gcmelt、2.5microl dNTP (10mM)、0.5microl Advanta  
25 ge Gcmelt polymerase Mix (クローンテック)、12.5microl大塚蒸留水を加えて合計25microlにした。反応液を、ThermalCycler9600を用いてPCR反応にかけた。PCRの条件は95℃・2分の変性の後、98℃・10秒、59℃・20秒、72℃・120秒のサイクルを35回繰り返した。PCR産物の一部を用いて電気泳動で約1300bpのPCR産物の増幅を確認した後、PCR産物をQuia

en PCR purification Kitを用いて精製し、TAクローニングキット (Invitrogen社) を用いて大腸菌 JM109 にサブクローニングし、大腸菌 JM109/pCR2.1-mouseAQ27 を取得した。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミド pCR2.1-mouseAQ27 を Qiagen QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、図 33 で示す配列がえられた。図 33 の DNA 配列から予測されるアミノ酸配列は図 34 に示すものであった。またヒト型およびラット型 AQ27 との相同性は図 35 のようであり、マウス型 AQ27 受容体であることが確認された。

10 参考例 19 RT-PCR による AQ27 受容体 mRNA のヒトにおける組織分布の検討

鋳型となる cDNA には、ヒト各種組織由来の polyA+RNA (クロンテック社) から以下の方法で合成したものを使用した。RNA 1  $\mu$ g からランダムプライマー、逆転写酵素として SuperScript II 逆転写酵素 (G  
15 IBCO BRL 社) を用い、添付のマニュアルに従って 42℃ で反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して 100  $\mu$ l に溶解した。RT-PCR は Sequence Detection System Prism 7700 (PE Biosystems 社) を用い、増幅と検出のためのプライマーとして 5' -CCAGAACATTTCCGACAACACTG-3' (配列番号:  
20 27), 5' -ACAGCGGTAGACTGGACAAA-3' (配列番号: 28) および TaqMan probe として 5' - (Fam) -TGCTTTTCATTTGCAAGATGGTGCC- (Tama) -3' (配列番号: 29) を使用した。RT-PCR 反応液は TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems 社)  
25 12.5  $\mu$ l に、それぞれ 100  $\mu$ M のプライマー溶液を 0.05  $\mu$ l、5  $\mu$ M の TaqMan probe を 0.5  $\mu$ l、および上記で調製した cDNA 溶液を 0.5  $\mu$ l 加え、蒸留水で総反応液量を 25  $\mu$ l とした。PCR 反応は 50℃・2 分、95℃・10 分の後、95℃・15 秒、60℃・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。得られたヒト各種組織における AQ27 受容体の mRNA

NA発現量はtotal RNA 25 ngあたりのコピー数として算出した(図36)。

参考例20 RT-PCRによるAQ27受容体mRNAのラットにおける組織分布の検討

- 5 鋳型となるcDNAには、ラット各種組織由来のpolyA+RNAから以下の方法で合成したものを使用した。RNA 1  $\mu$ gからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素(GIBCO BRL社)を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して100  $\mu$ lに溶解した。RT-PCRはSequence  
10 Detection System Prism 7700 (PE Biosystems社)を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5' -CGG AAGCCTGGGAATTCTG-3' (配列番号: 30), 5' -ATG TGTCTCCTTTGGTTTCTTCCA-3' (配列番号: 31) よびTaqMan probeとして5' - (Fam) -AGCAAAGTTA  
15 TCTCGACCACAGCGTCCA- (Tamra) -3' (配列番号: 32)を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems社) 12.5  $\mu$ lに、それぞれ100  $\mu$ Mのプライマー溶液を0.05  $\mu$ l、5  $\mu$ MのTaqMan probeを0.5  $\mu$ l、および上記で調製したcDNA溶液を0.  
20 5  $\mu$ l加え、蒸留水で総反応液量を25  $\mu$ lとした。PCR反応は50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。得られたラット各種組織におけるAQ27受容体のmRNA発現量はtotal RNA 25 ngあたりのコピー数として算出した(図36)。  
25 参考例21 RT-PCRによる新規分泌蛋白質GのmRNAのラットにおける組織分布の検討

Wistarラットより各種臓器を摘出し、total RNAをIsogen (ニッポンジーン社)、poly(A)+RNAをmRNA purification kit (Pharmacia社)により、それぞれのマニュアルにしたがって調製した。得られたpoly(A)+RNA 1  $\mu$ gを

Dnase I (Amplification Grade, GIBCO BRL社) 処理後、160 ng分をRNA PCR Kit (Takara社) を用いて、マニュアルに従い42℃でcDNAを合成した。合成されたcDNAはpoly (A)<sup>+</sup>RNA換算で4 ng/ $\mu$ lの溶液とし、以後のRT-PCRの鋳型として用いた。RT-PCRはSequence Detection System Prism 7700 (PE Biosystems社) を用い、増幅と検出のためのプライマーとして5' -AGCACACTGGCTTCCGTCTAG-3' (配列番号: 33), 5' -CGCTGGCCTTCTCTGAGTCA-3' (配列番号: 34) およびTaqMan probeとして5' - (Fam) AGGCAGGACAGTGGCAGTGAAGCC- (Tama) -3' (配列番号: 35) を使用した。RT-PCR反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems社) 12.5  $\mu$ lに、それぞれ100  $\mu$ Mのプライマー溶液を0.225  $\mu$ l、5  $\mu$ MのTaqMan probeを1.25  $\mu$ l、および上記で調製したcDNA溶液を0.5  $\mu$ l加え、蒸留水で総反応液量を25  $\mu$ lとした。PCR反応は50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。得られたラット各種組織における新規分泌蛋白質GのmRNA発現量はpoly (A)<sup>+</sup>RNA 1 ngあたりのコピー数として算出した (図37)。

参考例22 RT-PCRによる新規ヒト型分泌蛋白質のmRNAのヒトにおける組織分布の検討

mRNAの発現量検出のためのRT-PCRの鋳型となるcDNAには、ヒト各種組織由来のpoly A<sup>+</sup>RNA (クロンテック社) から以下の方法で合成したものを使用した。RNA 1  $\mu$ gからランダムプライマー、逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素 (GIBCO BRL社) を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿して100  $\mu$ lに溶解した。発現量の定量はSequence Detection System Prism 7700を用いて行った。増幅と検出の



ためのプライマーとして5' -TGAGAGCTTCACAGCCACA-3'  
 (配列番号: 36), 5' -AGCTGAAGCCGCCTTTCTT-3' (配  
 列番号: 37) およびTaqMan probeとして5' -(Fam)AACCTG  
 GCTGAGGAGCTCAATGGCTA-(Tamra)-3' (配列番  
 5 号: 38)を使用した。RT-PCR反応は参考例19と同様の方法で行った。

得られたヒト各種組織における新規ヒト型分泌蛋白質のmRNA発現量はp  
 oly (A)<sup>+</sup>RNA 1ngあたりのコピー数として算出した(図38)。  
 参考例23 in situハイブリダイゼーション法による新規分泌蛋白質  
 mRNAのラット脳における発現分布の検討

10 Wistarラットをネブタール麻酔下で開腹し、左心室から0.9%食  
 塩水を5分間灌流し、続いて4%パラホルムアルデヒド溶液を5分間灌流した。  
 取り出した脳を同溶液中に24時間4℃で浸漬したのち、30%スクロース溶  
 液に置換し、4℃で3日間浸漬し、解析に供する脳のサンプルを得た。

新規分泌蛋白質アンチセンス、センスプローブは以下の方法で調製した。

15 まず、プラスミドベクターpCRII TOPO (インビトロジェン社)に  
 自体公知の方法でラット型AQ27リガンドcDNAを挿入した。このcDN  
 Aを、M13プライマー (インビトロジェン社)・Advantage GC  
 2ポリメラーゼ (クロンテック社)を用いたPCRにて増幅・直鎖化し、エタ  
 ノール沈殿法により精製した。このcDNAから、DIG RNA Labe  
 20 lling KIT (SP6/T7) (ロッシュ社)にてSP6もしくはT  
 7によるin vitro transcriptionを行い(40μlス  
 ケール)、生成されたDIGラベルリボプローブをエタノール沈殿により精製  
 した。精製したプローブは大塚精製水100μlに溶解した。cDNAの挿入  
 方向から、SP6により生成されたDIGラベルリボプローブがアンチセンス  
 25 プローブ、T7により生成されたDIGラベルリボプローブがセンスプローブ  
 であった。

In situハイブリダイゼーションにはフリーフローティング法を使用  
 した。まずクライオスタットCM3050 (ライカ社)を用いて40μmの厚  
 さの前頭断凍結切片を作製した。つぎに切片をPBSで洗浄した後、1μg/

ml Proteinase Kを含む10mM Tris-HCl / 1  
mM EDTA (pH8.0) 処理 (37℃・15分) にてプロテアーゼ処  
理を行った。さらに、0.25%無水酢酸を含む0.1Mトリエタノールアミ  
ン (pH8.0) による処理 (室温・10分) にてアセチル化を行った後、  
5 hybridization buffer (50%ホルムアミド, 10m  
M Tris-HCl pH7.5, 1×Denhardt's solutio  
n, 200μg/ml tRNA, 10%デキストラン硫酸, 600mM NaCl,  
0.25% SDS, 1mM EDTA) による処理 (60℃・20  
分) にてpre-hybridization反応を行った。Hybridi  
10 zation反応には、hybridization bufferでアンチ  
センスプローブもしくはセンスプローブを1000倍に希釈し、85℃で3分  
変性した後、切片に加え60℃で12時間以上反応させた。引き続き、非特異  
的にhybridizationしたプローブを洗浄するため以下の操作を行  
った。1) 2×SSC (SSC; 1×SSC=150mM NaCl, 15m  
15 Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) / 50%ホルムアミド処理 (60℃・1  
5分・2回)、2) TNE (0.5M NaCl, 10mM Tris-HC  
l (pH7.6), 1mM EDTA) 処理 (37℃・10分)、3) 20m  
g/ml RNase A in TNE処理 (37℃・30分)、4) TN  
E処理 (37℃・10分)、5) 2×SSC処理 (60℃・15分・2回)、  
20 6) 0.5×SSC処理 (60℃・15分・2回)。以上の操作を行った後、D  
IGラベルプローブを検出するための免疫組織化学を行った。まず、DIG-  
1 (100mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.  
1% Tween20) で洗浄した後、1.5% Blocking rea  
gent (ロッシュ社) を含むDIG-1による処理 (37℃・1時間) に  
25 て非特異反応のブロッキングを行い、anti-DIG fab-fragm  
ent antibody conjugated with alkali  
ne phosphatase (ロッシュ社) を含むDIG-1 (1:100  
0) を室温で1時間反応させた。DIG-1で十分洗浄した後、DIG-3 (  
100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 50m

MgCl<sub>2</sub>) でリンスし、0.18mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) を含むジメチルホルムアミド、および0.34mg/ml 4-nitroblue tetrazolium (NBT) を含む70%ジメチルホルムアミドを、DIG-3 1mlにつきそれぞれ3.5mlおよび4.5ml加えた溶液によって、室温にて発色反応を行った。適時に発色をPBS洗浄により止めた後、切片をスライドガラスに載せ、90%グリセロールを含むPBSで封入し、光学顕微鏡で観察した。

アンチセンスプローブにて特異的に発色していたのは、視床下部のretrochiasmatic areaを中心に、arcuate nucleusの吻側、特に背側部・外側部にかけてであった。これらの領域においてセンスプローブによる発色は検出されなかった。

上記部位では、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、POMCが発現し（ともに摂食抑制）、またレプチン受容体が高濃度に存在することが知られている。このことから、AQ27リガンドは摂食を制御すると考えられる。arcuate nucleusはGHRHの存在する部位で、正中隆起外層に投射する神経があることが知られている。このことから、新規分泌蛋白質は神経内分泌に関与すると考えられる。さらに、参考例24に記すAQ27mRNAの分布と併せ考えると、新規分泌蛋白質が睡眠・覚醒、痛覚、交感神経系、自発行動・情動行動等を制御・修飾すると考えられる。

参考例24 in situハイブリダイゼーション法によるAQ27mRNAのラット脳における発現分布の検討

Wistarラットをネンブータル麻酔下で開腹し、左心室から0.9%食塩水を5分間灌流し、続いて4%パラホルムアルデヒド溶液を5分間灌流した。取り出した脳を同溶液中に24時間4℃で浸漬したのち、30%スクロース溶液に置換し、4℃で3日間浸漬し、解析に供する脳のサンプルを得た。

AQ27アンチセンス、センスプローブは以下の方法で調製した。

まず、プラスミドベクターpCRII TOPO (インビトロジェン社) に

自体公知の方法でラット型AQ27 cDNAを挿入した。このcDNAを、M13プライマー（インビトロジェン社）・Advantage GC2ポリメラーゼ（クロンテック社）を用いたPCRにて増幅・直鎖化し、エタノール沈殿法により精製した。このcDNAから、DIG RNA Labelling  
5 g KIT (SP6/T7)（ロッシュ社）にてSP6もしくはT7による*in vitro transcription*を行い（40  $\mu$ lスケール）、生成されたDIGラベルリボプローブをさらに40 mM NaHCO<sub>3</sub>, 60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.2により400 bpにアルカリ加水分解した後エタノール沈殿により精製した。精製したプローブは大塚精製水100  $\mu$ lに溶  
10 解した。cDNAの挿入方向から、SP6により生成されたDIGラベルリボプローブがアンチセンスプローブ、T7により生成されたDIGラベルリボプローブがセンスプローブであった。

*In situ*ハイブリダイゼーションにはフリーフローティング法を使用した。まずクライオスタットCM3050（ライカ社）を用いて40  $\mu$ mの厚  
15 さの前頭断凍結切片を作製した。つぎに切片をPBSで洗浄した後、1  $\mu$ g/ml Proteinase Kを含む10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA (pH 8.0) 処理（37℃・15分）にてプロテアーゼ処理を行った。さらに、0.25%無水酢酸を含む0.1 M トリエタノールアミン (pH 8.0) による処理（室温・10分）にてアセチル化を行った後、hybridization buffer（50%ホルムアミド, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1×Denhardt's solution, 200  
20  $\mu$ g/ml tRNA, 10%デキストラン硫酸, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, 1 mM EDTA）による処理（60℃・20分）にてpre-hybridization反応を行った。Hybridization  
25 反応には、hybridization bufferでアンチセンスプローブもしくはセンスプローブを1000倍に希釈し、85℃で3分変性した後、切片に加え60℃で12時間以上反応させた。引き続き、非特異的にhybridizationしたプローブを洗浄するため以下の操作を行った。1) 2×SSC (SSC; 1×SSC=150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナト

リウム, pH7.0) / 50%ホルムアミド処理 (60℃・15分・2回)、  
2) TNE (0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1mM EDTA) 処理 (37℃・10分)、3) 20mg/ml RNase A in TNE処理 (37℃・30分)、4) TNE処理 (37℃・10分)、5) 2×SSC処理 (60℃・15分・2回)、6) 0.5×SSC処理 (60℃・15分・2回)。以上の操作を行った後、DIGラベルプローブを検出するための免疫組織化学を行った。まず、DIG-1 (100mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) で洗浄した後、1.5% Blocking reagent (ロッシュ社) を含む DIG-1 による処理 (37℃、1時間) にて非特異反応のブロッキングを行い、anti-DIG fab-fragment antibody conjugated with alkaline phosphatase (ロッシュ社) を含むDIG-1 (1:1000) を室温で1時間反応させた。DIG-1で十分洗浄した後、DIG-3 (100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>) でリンスし、0.18mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) を含むジメチルホルムアミド、および0.34mg/ml 4-nitroblue tetrazolium (NBT) を含む70%ジメチルホルムアミドを、DIG-3 1mlにつきそれぞれ3.5mlおよび4.5ml加えた溶液によって、4℃にて一晚発色反応を行った。適時に発色をPBS洗浄により止めた後、切片をスライドガラスに載せ、90%グリセロールを含むPBSで封入し、光学顕微鏡で観察した。

アンチセンスプローブにて特異的に発色していたのは、piriform cortex (梨状皮質)、cortex-amygdala transition zone (皮質扁桃移行帯)、ventral pallidum (淡蒼球)、lateral preoptic area (視索前野)、ventromedial hypothalamic nucleus (腹内側核)、zona incerta (不確帯)、posterior hypo

thalamic area (視床下部後核)、marginal zone  
median geniculate (内側膝状周辺帯)、dorsal r  
aphe nucleus (背側縫線核)、nucleus of brac  
hium inferior colliculus (下丘腕核)、inte  
5 rgeniculate leaf (膝状体間小葉)、locus coer  
uleus (青斑核)、central gray, alpha-beta p  
art (中心灰白質) 等であった (図39)。特にdorsal raphe  
nucleus (背側縫線核)、locus coeruleus (青斑核)  
では強い発色が認められた。これらの領域ではセンスプローブによる発色は検  
10 出されなかった。

以上の結果から、新規分泌蛋白質/AQ27は視床下部で統合された情報を  
大脳-脳幹に伝達する役割を担うと考えられた。具体的には、1) 摂食、2)  
睡眠・覚醒、3) 痛覚、4) ストレス応答、5) 自発行動・情動行動等の制御  
・修飾作用が示唆された。

15 参考例25 新規ヒト型分泌蛋白質遺伝子を導入したCHO細胞上清中のAQ  
27 特異的活性成分の精製

まず定法により、新規ヒト型分泌蛋白質遺伝子全長 (配列番号: 24) を発  
現ベクターpAKKO-H111に導入した。このベクターをリポフェクトア  
ミン2000 (Gibco-BRL) を用いてトランスフェクションし、一過  
20 性にCHO細胞において新規ヒト型分泌蛋白質を発現させ、培養上清を取得し  
た。この培養上清中に、ベクターのみを導入したCHO細胞 (mock CHO  
細胞) の培養上清と比較して、HEK細胞に一過性に発現させたオーファン  
レセプターAQ27に対して特異的な刺激活性を見出した (図40)。AQ2  
7 特異的な刺激活性の検出は、cAMPレスポンスエレメント (CRE) プロ  
25 モーターの発現誘導によって産生されるレポーター遺伝子産物 (ルシフェラー  
ゼ) の発現量を指標に行った。

次に、この発現ベクターを、ジーントランスファー (和光純薬) を用いてC  
HOdhfr細胞にトランスフェクションし、ヒト型AQ27リガンド遺伝  
子を恒常的に発現するCHO細胞を取得した。この新規ヒト型分泌蛋白質遺伝

子発現CHO細胞を培養し、培養上清を得た。

培養上清からの精製にあたって、既知RFアミドペプチドを認識する抗体が新規ヒト型分泌蛋白質を認識し得るか、液相の競合法で検討したところ、抗RFRP-1抗体の1F3-1がヒト型分泌蛋白質のC末端構造を認識することが判明した（図41）。

培養上清を2.4L取得し、1F3-1抗体を用いたアフィニティー精製を行った。まず、上清を煮沸し、遠心にて析出物を取り除き、1F3-1抗体を結合させたNHS-activated Sepharoseカラム（アマシャムバイオサイエンス）にアプライした。カラムを1.0M NaClを加えたPBS（Phosphate Buffered Saline）にて洗浄後、0.5M NaClを含む0.2M Glycine-HCl pH2.2で1F3-1抗体を結合させたNHS-activated Sepharoseカラムに結合した成分を溶出した。この溶出画分を、Vydac C18 218TP5415カラムにアプライし、20～35%アセトニトリルの濃度勾配で溶出したところ、2つのピークのAQ27特異的な刺激活性が検出された（図42）。それぞれの活性ピークをμRPC C2/C18 SC2.1/10カラムで分離したところ、それぞれ活性ピークは2つに分かれ合計4つの活性ピーク1～4が得られた（図43および図44）。

4つの活性画分に含まれるペプチドの分子量をMALDI-TOF-MSで測定した。図43および図44に示されるそれぞれの活性ピークに含まれるペプチドの測定分子量とそれらに対応するヒト型分泌蛋白質遺伝子から推測される分子量の理論値およびアミノ酸配列を図45に示す。

参考例26 長さの異なるヒト型ペプチドのAQ27発現CHO細胞株に対するcAMP産生抑制試験

AQ27を発現させたCHO細胞を、96穴プレート（ファルコン）に4×10<sup>4</sup>個/wellでまき、37℃、5%CO<sub>2</sub>・95%airで一晩培養した。アッセイ用バッファーとして、Hanks'Balanced Salt Solution（ギブコ）に、終濃度0.1% ウシ血清アルブミン（BSA、シグマ）、200μM 3-isobutyl-1-methylxanth

- ine (シグマ)、20mM HEPES (pH7.4) (ギブコ)を加えたものを調製した。試料希釈用バッファーとしてアッセイ用バッファーに終濃度2 $\mu$ M フォルスコリンを添加したものを作成、これを用い図46に示した試料ペプチドを、 $2 \times 10^{-6}$ M、 $2 \times 10^{-7}$ M、 $2 \times 10^{-8}$ M、 $2 \times 10^{-9}$ M、  
5  $2 \times 10^{-10}$ M、 $2 \times 10^{-11}$ Mに希釈した。一晚培養した細胞は、アッセイ用バッファー150 $\mu$ lで二回洗浄後交換して30分、37℃、100% airで培養し、同様に2回洗浄して、アッセイ用バッファー50 $\mu$ l、試料溶液50 $\mu$ lを添加し、攪拌した後30分、37℃、100% airで培養した。細胞内cAMP量を、cAMP-Screen™ System (ABI)を用い、  
10 本キットのプロトコールに従い測定した。Maximam levelのcAMP量と各サンプルを添加した時のcAMP量の差を算出して、フォルスコリンによるcAMP産生促進量に対する百分率を算出し、これをcAMPの産生の抑制率とした(図47)。図46に各試料のEC<sub>50</sub>値を示す。この結果から、本発明のヒト型ペプチドがAQ27受容体を介して細胞内cAMP産  
15 生抑制活性を示すことが明らかになった。

#### 実施例1 新規ヒト型分泌蛋白質のラットコルチコステロンの分泌刺激活性

- AQ27受容体がラット副腎で高い発現をしていることから、副腎ホルモンの分泌に作用する可能性があるため、図46に記載のAQ27L-43をラットに投与して副腎皮質ホルモンに対する影響を調べた。8週齢のオスWist  
20 arラットを軽く固定し尾静脈からAQ27L-43を生理食塩水に溶解し0.5mg/ラットの濃度で投与し30分後に断頭により採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットコルチコステロン測定キット(アマーシャム社)を用いて測定したところAQ27投与ラットで血中コルチコステロンの上昇が観察できた。

- 25 実施例2 新規ヒト型分泌蛋白質のラットコルチコステロンの分泌刺激活性

AQ27受容体がラット副腎で高い発現をしていることから、副腎ホルモンの分泌に作用する可能性があるため、図46に記載のAQ27L-43をラットに投与して副腎皮質ホルモンに対する影響を調べた。8週齢のオスWist  
arラットにカニュレーションを行い静脈からAQ27L-43を生理食塩水



に溶解し0.5mg/ラットの濃度で投与し採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットコルチコステロン測定キット（アマーシャム社）を用いて測定したところAQ27L-43投与ラットで血中コルチコステロンの上昇傾向が観察できた（図48）。

#### 実施例3 新規ヒト型分泌蛋白質のラットテストステロンの分泌刺激活性

AQ27受容体がラット副腎で高い発現をしていることから、副腎ホルモンの分泌に作用する可能性があるため、図46に記載のAQ27L-43をラットに投与して副腎皮質ホルモンに対する影響を調べた。8週齢のオスWistarラットにカニュレーションを行い静脈からAQ27L-43を生理食塩水に溶解し0.5mg/ラットの濃度で投与し採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットテストステロン測定キット（日本シェーリング社）を用いて測定したところAQ27L-43投与ラットで血中テストステロンの上昇傾向が観察できた（図49）。

#### 実施例4 新規ヒト型分泌蛋白質のラットアルドステロンの分泌刺激活性

AQ27受容体がラット副腎で高い発現をしていることから、副腎ホルモンの分泌に作用する可能性があるため、図46に記載のAQ27L-43をラットに投与して副腎皮質ホルモンに対する影響を調べた。8週齢のオスWistarラットにカニュレーションを行い静脈からAQ27L-43を生理食塩水に溶解し0.5mg/ラットの濃度で投与し採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットアルドステロン測定キット（日本ダイナボット社）を用いて測定したところAQ27L-43投与ラットで血中アルドステロンの上昇が観察できた（図50）。

#### 実施例5 新規ヒト型分泌蛋白質のラットアルドステロン分泌刺激活性の時間経過と濃度依存性

AQ27受容体がラットアルドステロンの分泌に作用があるため、図46に記載のAQ27L-43をラットに投与して時間経過と濃度依存性を調べた。8週齢のオスWistarラットにカニュレーションを行い静脈からAQ27

L-43を生理食塩水に溶解し4nmol/kg、40nmol/kg、400nmol/kgの濃度で投与し採血を行った。またコントロールとして生理食塩水を投与したラットから採血した。これらの血清成分をラットアルドステロン測定キット（日本ダイナボット社）を用いて測定したところ40nmol/kg、400nmol/kgのAQ27L-43投与ラットで血中アルドステロンの上昇が観察できた（図51）。

#### 産業上の利用可能性

本発明の新規分泌蛋白質は副腎皮質ホルモン分泌調節作用を有しており、  
10 本発明の新規分泌蛋白質またはそのDNAは、副腎皮質ホルモン分泌調節剤などとして有用である。

さらに、本発明の新規分泌蛋白質と結合するAQ27受容体は、本発明の新規分泌蛋白質とAQ27受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングに有用であり、スクリーニングで得られる化合物は副腎皮質ホルモン  
15 分泌調節剤として使用することができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。  
5
2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列である請求項1記載の剤。
3. 部分ペプチドが、  
10
  - (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - (2) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、  
15
  - (3) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、または
  - (4) 配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド  
20
4. 部分ペプチドが、  
25
  - (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目または第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、

- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のグルタミン残基(Gln)がピログルタミン化されているペプチド、または
- (3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のアルギニン残基(Arg)がチロシン残基(Tyr)に置換されているペプチドである請求項1記載の剤。
- 5
5. 副腎皮質ホルモン分泌促進剤である請求項1記載の剤。
6. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項5記載の剤。
- 10
7. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。
8. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7
- 15
- で表わされるアミノ酸配列である請求項7記載の剤。
9. 部分ペプチドが、
- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第80番目～88番目のアミノ酸配列または第127番目～133番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- 20
- (2) 配列番号：3で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- (3) 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列の第116番目～122番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- 25
- または
- (4) 配列番号：7で表わされるアミノ酸配列の第125番目～131番目のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項7記載の剤。
10. 部分ペプチドが、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列、第91番目～133番目のアミノ酸配列、第93番目～133番目のアミノ酸配列、第104番目～133番目のアミノ酸配列、第108番目～133番目のアミノ酸配列、第109番目～133番目のアミノ酸配列、第111番目～133番目のアミノ酸配列、第115番目～133番目のアミノ酸配列、第119番目～133番目のアミノ酸配列、第124番目～133番目のアミノ酸配列、第126番目～133番目または第127番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチド、
- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第91番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のグルタミン残基 (G l n) がピログルタミン化されているペプチド、または
- (3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第90番目～133番目のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端のアルギニン残基 (A r g) がチロシン残基 (T y r) に置換されているペプチドである請求項7記載の剤。
- 15 11. 副腎皮質ホルモン分泌促進剤である請求項7記載の剤。
12. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項11記載の剤。
13. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、C R H産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。
- 25 14. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌

調節剤。

15. 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である請求項14記載の剤。

16. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項15記載の剤。

17. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。

18. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

19. 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である請求項18記載の剤。

20. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項19記載の剤。

21. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス

ポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。

22. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

23. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤。

24. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項23記載の剤。

25. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

26. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項25記載の剤。

27. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を

含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

28. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤。

29. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項28記載の剤。

30. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

31. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項30記載の剤。

32. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

33. 副腎皮質ホルモン分泌促進剤である請求項32記載の剤。

34. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項33記載の剤。

35. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。



36. 副腎皮質ホルモン分泌促進剤である請求項35記載の剤。
37. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項36記載の剤。
- 5 38. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、
- 10 副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。
- 15 39. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。
40. 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である請求項39記載の剤。
41. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項40記載の剤。
- 20 42. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、
- 25

アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。

- 5 43. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

44. 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤である請求項43記載の剤。

- 10 45. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項44記載の剤。

- 15 46. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛み、肥満、クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の診断剤。

- 20 47. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

48. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミ

ノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7 受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤。

- 5 4 9. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項 4 8 記載の剤。

- 5 0. 配列番号：9、配列番号：1 1 または配列番号：1 3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7 受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

- 10 5 1. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項 5 0 記載の剤。

5 2. 配列番号：9、配列番号：1 1 または配列番号：1 3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7 受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

- 20 5 3. 配列番号：9、配列番号：1 1 または配列番号：1 3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7 受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤。

- 25 5 4. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項 5 3 記載の剤。

5 5. 配列番号：9、配列番号：1 1 または配列番号：1 3 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7 受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

- 5 56. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項55記載の剤。

- 10 57. (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩と(2) 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる副腎皮質ホルモン分泌調節剤。

- 15 58. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対するアゴニストを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌促進剤。

- 20 59. 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤である請求項58記載の剤。

60. 配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる副腎皮質ホルモン分泌阻害剤。

- 25 61. クッシング病、クッシング症候群、副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、ストレス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症候群の予防・治療剤である請求項60記載の剤。

62. 哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩または⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストの有効量を投与することを特徴とする（i）副腎皮質ホルモン分泌促進方法または（ii）低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療方法。
63. 哺乳動物に対して、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、

- そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、②配列番号：1  
で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有  
する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補  
的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、
- 5 ③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミ  
ノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはその  
エステルまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、④配列番号：1  
で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有  
する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたは
- 10 その塩の発現を阻害する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：1  
1または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同  
一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩  
に対する抗体、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わ  
されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA
- 15 Q27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的  
な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンスポリヌクレオチド、⑦  
配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配  
列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、そ  
の部分ペプチドまたはその塩の機能を阻害する化合物またはその塩、⑧配列番
- 20 号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同  
一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分  
ペプチドまたはその塩の発現を阻害する化合物またはその塩または⑨配列番  
号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同  
一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその
- 25 塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする（i）副腎皮  
質ホルモン分泌阻害方法または（ii）クッシング病、クッシング症候群、副腎  
皮質刺激ホルモン産生下垂体腫瘍、CRH産生腫瘍、アルドステロン産生腫瘍、  
アルドステロン症、原発性コルチゾール抵抗症、先天性副腎酵素欠乏症、スト  
レス、うつ病、神経性食欲不振症、不眠、胃・十二指腸潰瘍または過敏性腸症

候群の予防・治療方法。

64. (i) 副腎皮質ホルモン分泌促進剤または(ii) 低アルドステロン症、低コルチゾール血症、続発性または慢性副腎皮質機能低下症、アジソン病、副腎機能不全、痛みまたは肥満の予防・治療剤を製造するための、①配列番号：

- 5 1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは
- 10 は実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩、⑤配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩、⑥配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- 20 ⑦配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の機能を促進する化合物またはその塩、⑧配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体、その部分ペプチドまたはその塩の発現を促進する化合物またはその塩または⑨配列番号：9、配列番号：11または配列番号：13で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するAQ27受容体またはその塩に対するアゴニストの使用。

65. (i) 副腎皮質ホルモン分泌阻害剤または(ii) クッシング病、クッシ





有するA Q 2 7受容体またはその塩に対するアンタゴニストの使用。

- 6 6. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および（または）配列番号：9、配列番号：1 1または配列番号：1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする副腎皮質ホルモン分泌調節薬のスクリーニング方法。
- 6 7. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する分泌蛋白質、その部分ペプチド、そのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および（または）配列番号：9、配列番号：1 1または配列番号：1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする副腎皮質ホルモン分泌調節薬のスクリーニング用キット。
- 6 8. 試験化合物を非哺乳動物に投与し、血中の副腎皮質ホルモンの濃度を測定することを特徴とする配列番号：9、配列番号：1 1または配列番号：1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。
- 6 9. 配列番号：9、配列番号：1 1または配列番号：1 3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するA Q 2 7受容体またはその塩を活性化する化合物またはその塩を非ヒト哺乳動物に投与した場合と、該A Q 2 7受容体を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を非ヒト哺乳動物に投与した場合における、血中の副腎皮質ホルモンの濃度を測定し、比較することを特徴とする該A Q 2 7受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

1/51

☒ 1

atggtaaggc cttacccctt gatctacttc ctcttcttgc cgttggggcg ctccttccct 60  
ctactggaca gaagagagcc cacagacgcc atgggtggcc tcggagctgg agaacgctgg 120  
ggcgacctgg ccatggggcc ccgacccac tccgtgtggg gtctctctcg gtggctgaga 180  
gcttcacagc cacaggccct gcttgtcata gccaggggcg tgcagacatc gggaagagag 240  
catgtggct gcagattccg ctctggggag caggacgaag gcagtggagg caccggcttc 300  
ctccctgtcg cgggggagaa gaaccagcgg ccgttaggga acctggctga ggagctcaat 360  
ggctacagca ggaagaaagg cggcttcagc tccggcttcg gtcggcgggtg a 411

2/51

2

Met Val Arg Pro Tyr Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Leu Pro Leu Gly  
                     5                    10                    15  
 Ala Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Glu Pro Thr Asp Ala Met Gly  
                     20                    25                    30  
 Gly Leu Gly Ala Gly Glu Arg Trp Ala Asp Leu Ala Met Gly Pro Arg  
                     35                    40                    45  
 Pro His Ser Val Trp Gly Ser Ser Arg Trp Leu Arg Ala Ser Gln Pro  
                     50                    55                    60  
 Gln Ala Leu Leu Val Ile Ala Arg Gly Leu Gln Thr Ser Gly Arg Glu  
                     65                    70                    75                    80  
 His Ala Gly Cys Arg Phe Arg Phe Gly Arg Gln Asp Glu Gly Ser Glu  
                     85                    90                    95  
 Ala Thr Gly Phe Leu Pro Ala Ala Gly Glu Lys Thr Ser Gly Pro Leu  
                     100                    105                    110  
 Gly Asn Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Lys Gly Gly  
                     115                    120                    125  
 Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg Arg End  
                     130                    135

3/51

☒ W

atgaggigcc tcigcictig gcttggcctc ctccggcctc tgagtgccig cttcctcig 60  
ctggacagaa ggggacccac agacatcggc agacatcggag ccagaaatgag ctgggtccag 120  
ctgactgagg gacacacccc ccgctcagtt caaagtcac ggcacacaggc ccigcicgig 180  
glggccaagg agcagcaggc ctctgcagg ggcacacactg gcttcgctc agggaggcag. 240  
gacagtggca g'gaaagccac ggggtlccig ccacatgact cagagaaggc cagcggcccc 300  
ctgggggactc lggcagagga gctcagcagc tacagccggc ggaaggaggag cttcagcttc 360  
cgctcggcc gglga 375

4/51

图 4

Met	Arg	Cys	Leu	Cys	Ser	Trp	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala	
				5					10						15	
Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Gly	Pro	Thr	Asp	Ile	Gly	Asp	Ile	
			20					25						30		
Gly	Ala	Arg	Met	Ser	Trp	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Gly	His	Thr	Pro	Arg	
		35					40					45				
Ser	Val	Gln	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Glu	
	50					55					60					
Gln	Gln	Ala	Ser	Arg	Arg	Glu	His	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Arg	Gln	
65					70					75					80	
Asp	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Glu	Lys	
				85				90						95		
Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ser	
			100					105						110		
Arg	Arg	Lys	Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	End				
		115					120					125				

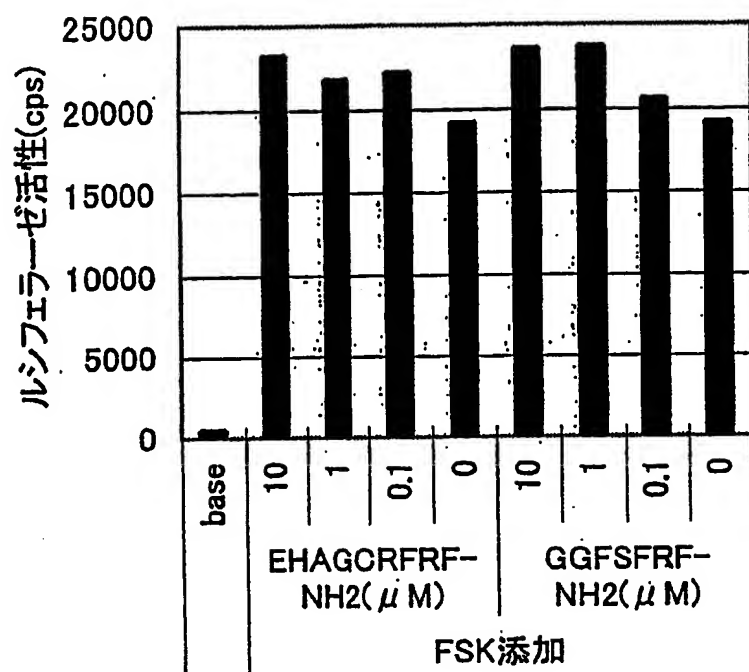
5/51

5

human	M	V	R	P	Y	P	L	I	Y	F	L	F	L	P	L	G	A	C	F	P	L	L	D	R	R	E	P	T	D	A	M	G	G	L	G	A	G	E	R	W	A	D	L	A	M	G	P	R	P	R	H	50
rat	M	R	C	L	C	S	W	L	C	-	L	L	P	L	S	A	C	F	P	L	L	D	R	R	G	P	T	D	-	I	G	D	I	C	A	R	M	S	W	V	Q	L	T	E	G	H	T	P	R	48		
human	S	V	W	G	S	S	R	W	L	R	A	S	Q	P	Q	A	L	L	V	I	A	R	G	L	Q	T	S	G	R	E	H	A	G	C	R	P	R	F	G	R	Q	D	E	G	S	E	A	T	G	F	100	
rat	S	V	-	-	-	-	-	-	-	Q	S	P	R	P	Q	A	L	L	V	V	A	K	E	Q	A	S	R	R	E	H	T	G	-	-	P	R	L	G	R	Q	D	S	G	S	E	A	T	G	F	89		
human	L	P	A	A	G	E	K	T	S	G	P	L	G	N	L	A	E	E	L	N	G	Y	S	R	K	K	G	G	F	S	F	R	F	G	R	R	136															
rat	L	P	T	D	S	E	K	A	S	G	P	L	G	T	L	A	E	E	L	S	S	Y	S	R	R	K	G	G	F	S	F	R	F	G	R	124																

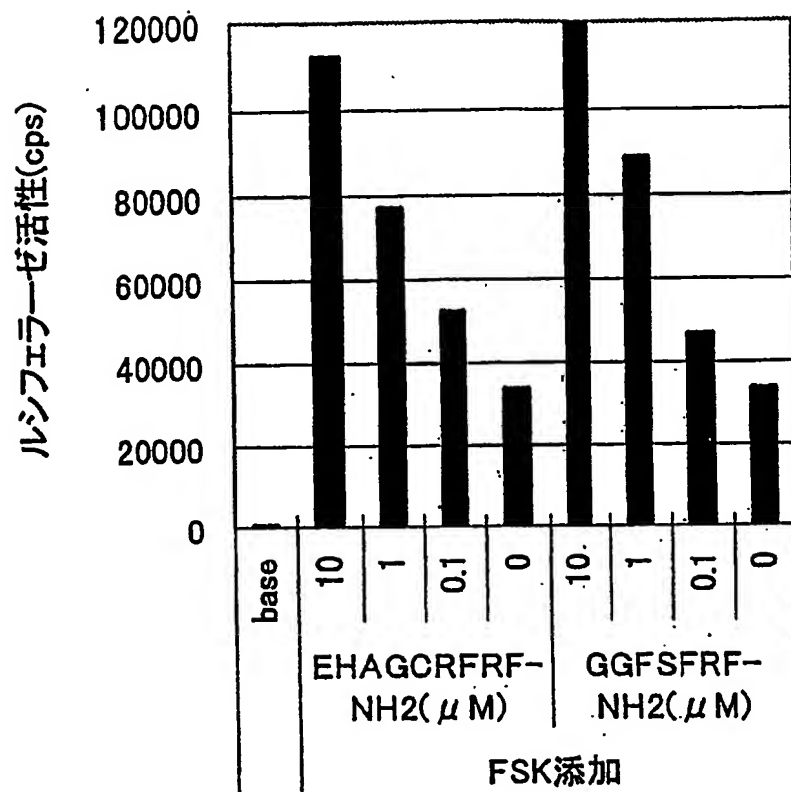
6/51

図 6



7/51

図 7





 00

atgaggggct tccggccctt gctttcccta ctttccctc tgagtgcctg ctttccctg 60  
 ctggacagaa ggggaaccac agacatcggg gacalcggag ccaggatgaa ctgggcccag 120  
 ctggctgagg gacatccccc caactcgggt caaaatccac agccacaggc cctgcttgtag 180  
 gtggccaggg agcagcaggc ctcccacagg gagcacaccg gcttccgtct agggaggcaca 240  
 gacggtagca gtgaggccgc agggttcctg cccgccgact cggagaaggc cagcggccct 300  
 ctggggactc tggcagaggga gctgagcagc tacagccggga ggaaggaggagg cttcagcttc 360  
 cgctttggac ggtga 375

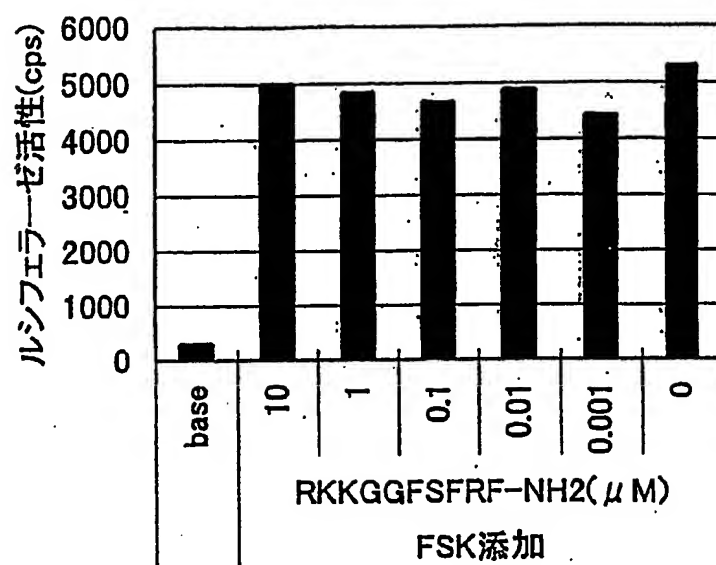
9/51

9

Met	Arg	Gly	Phe	Arg	Pro	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Ala			
				5					10					15				
Cys	Phe	Pro	Leu	Leu	Asp	Arg	Arg	Gly	Pro	Thr	Asp	Ile	Gly	Asp	Ile			
			20					25					30					
Gly	Ala	Arg	Met	Asn	Trp	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Gly	His	Pro	Pro	Asn			
		35					40					45						
Ser	Val	Gln	Asn	Pro	Gln	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Arg	Glu			
	50					55					60							
Gln	Gln	Ala	Ser	His	Arg	Glu	His	Thr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Arg	Gln			
	65				70				75					80				
Asp	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Ala	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	Lys			
			85					90					95					
Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ser			
			100					105					110					
Arg	Arg	Lys	Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	End						
		115					120					125						

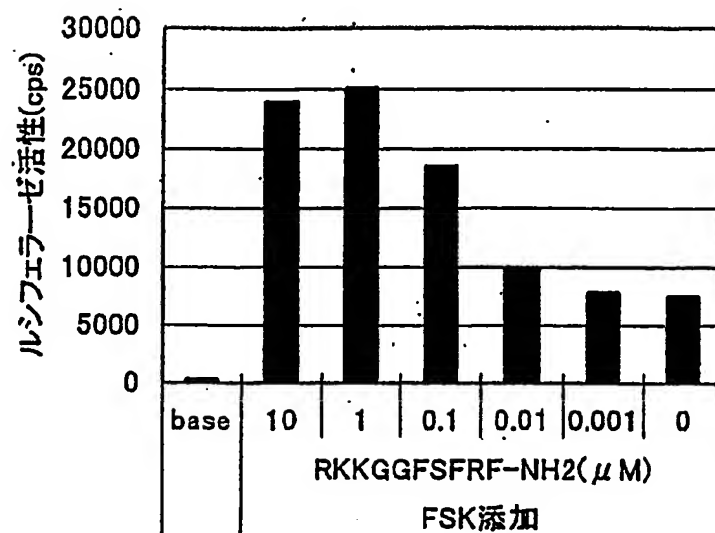
10/51

☒ 1 O



11/51

図 1 1



12/51

Figure 1 2

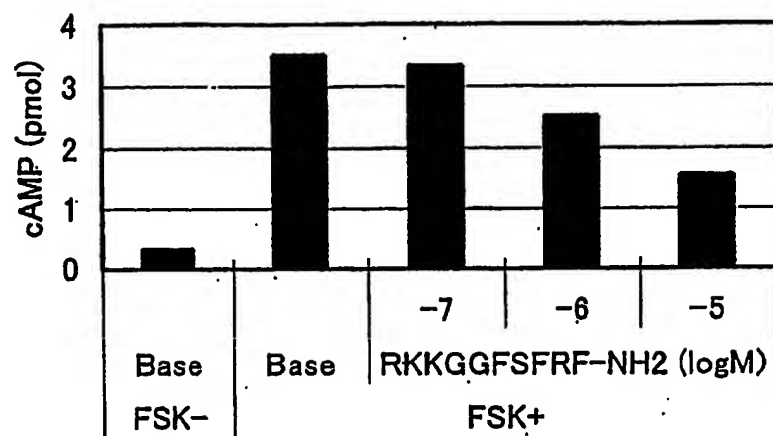
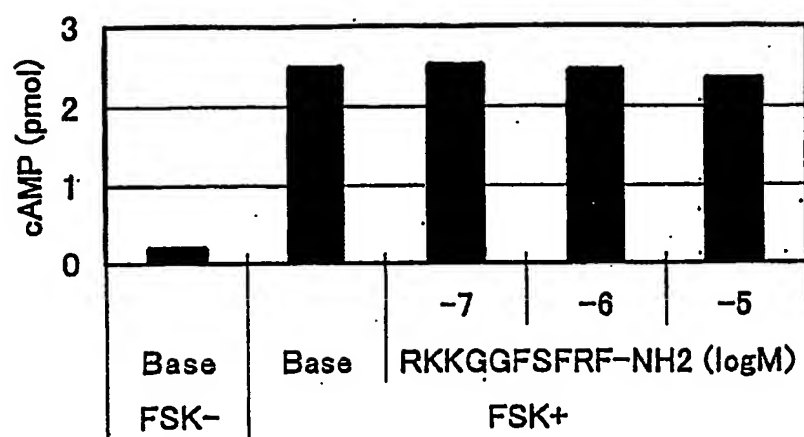
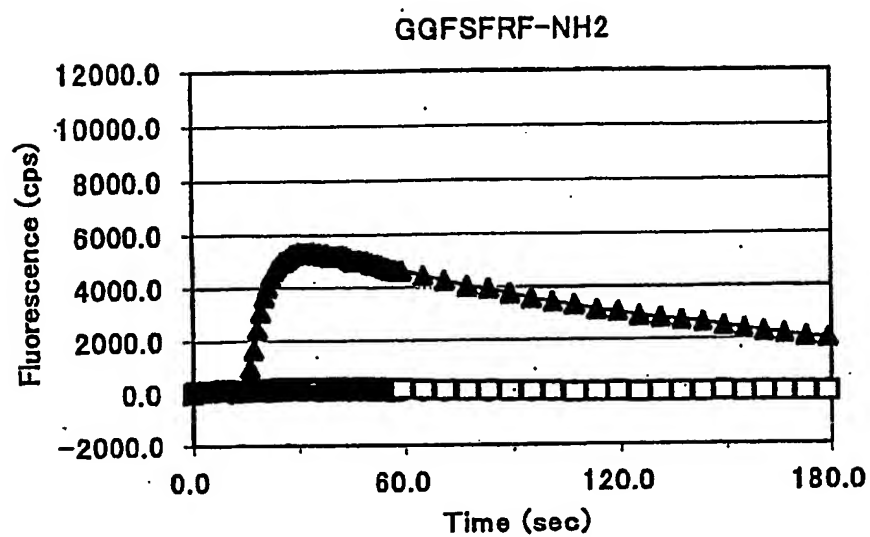


Figure 13



14/51

☒ 1 4



15/51

15

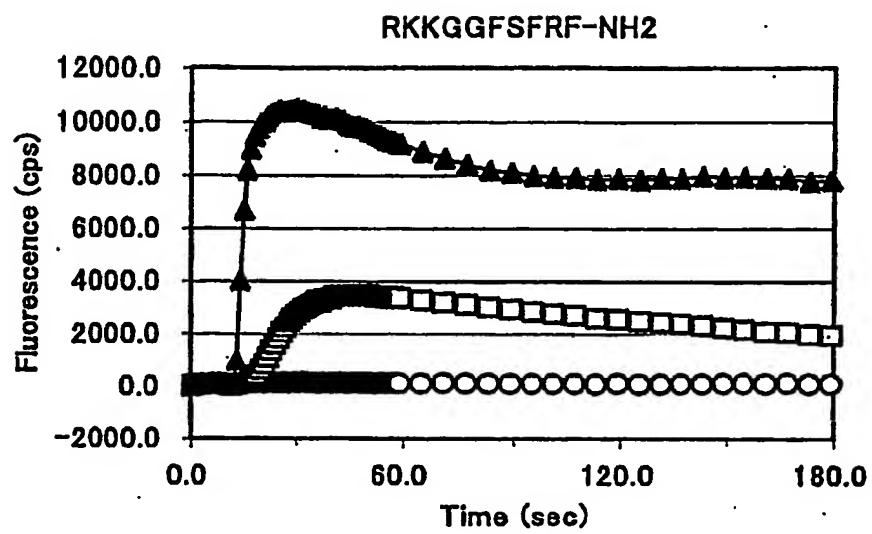




図 16

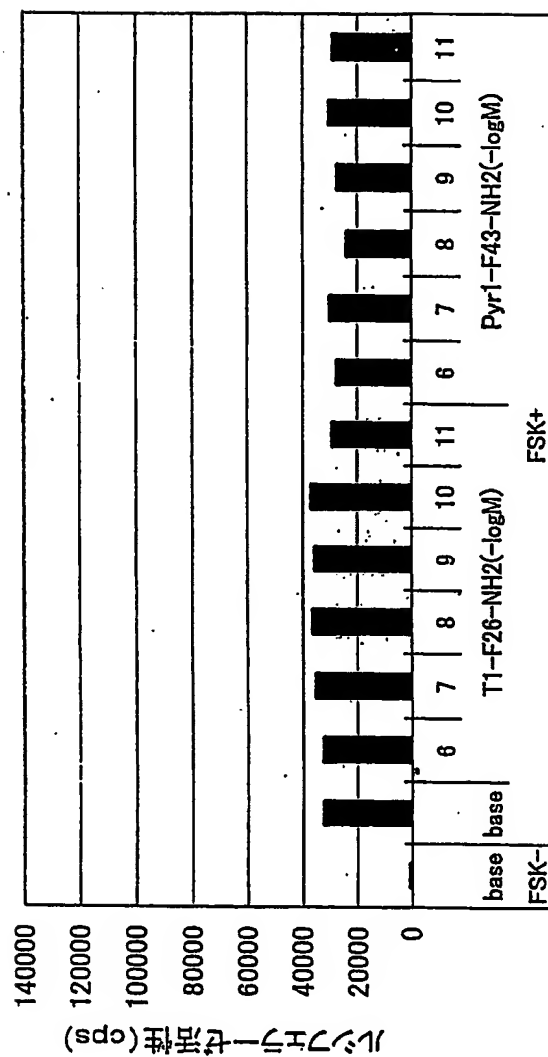
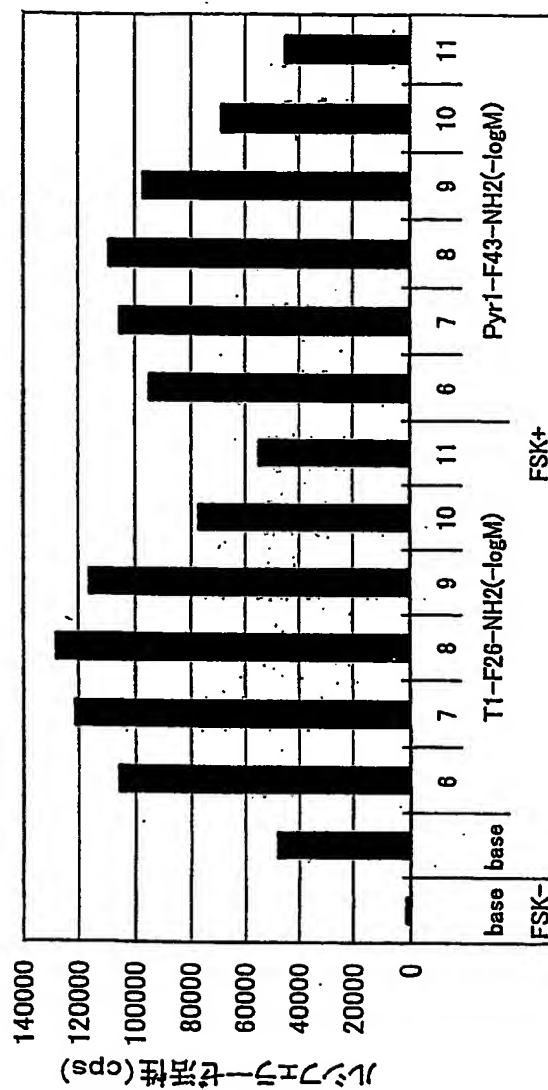
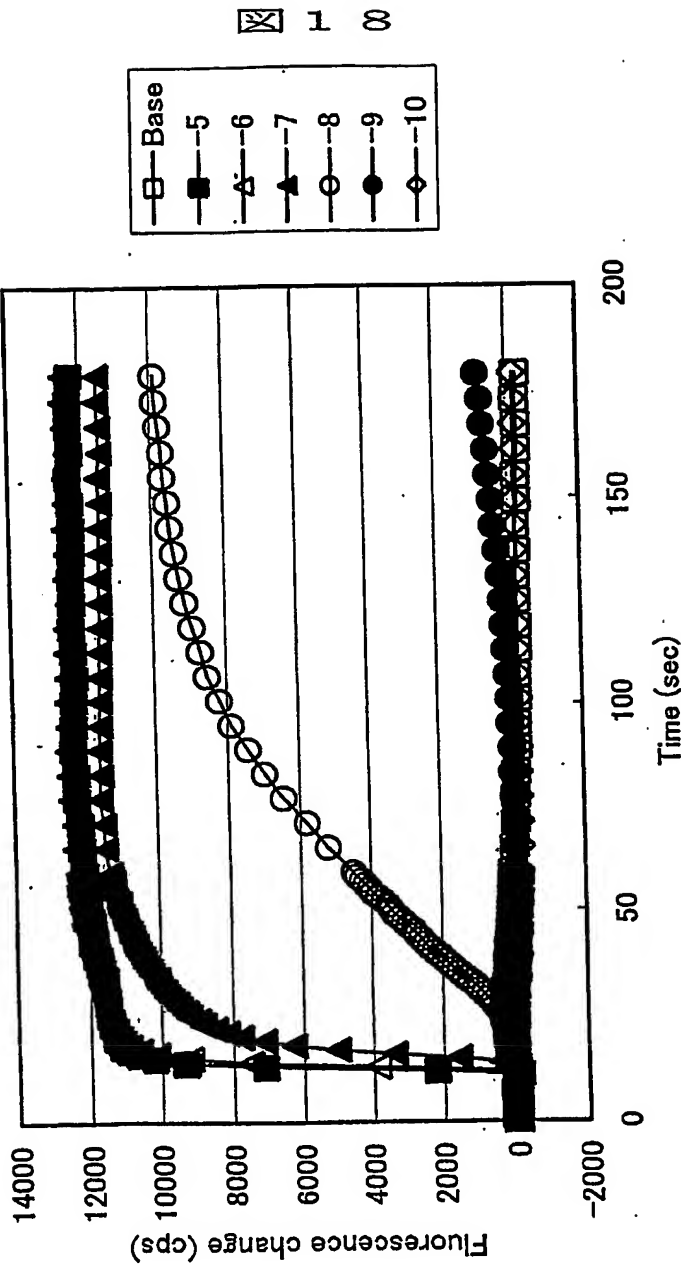


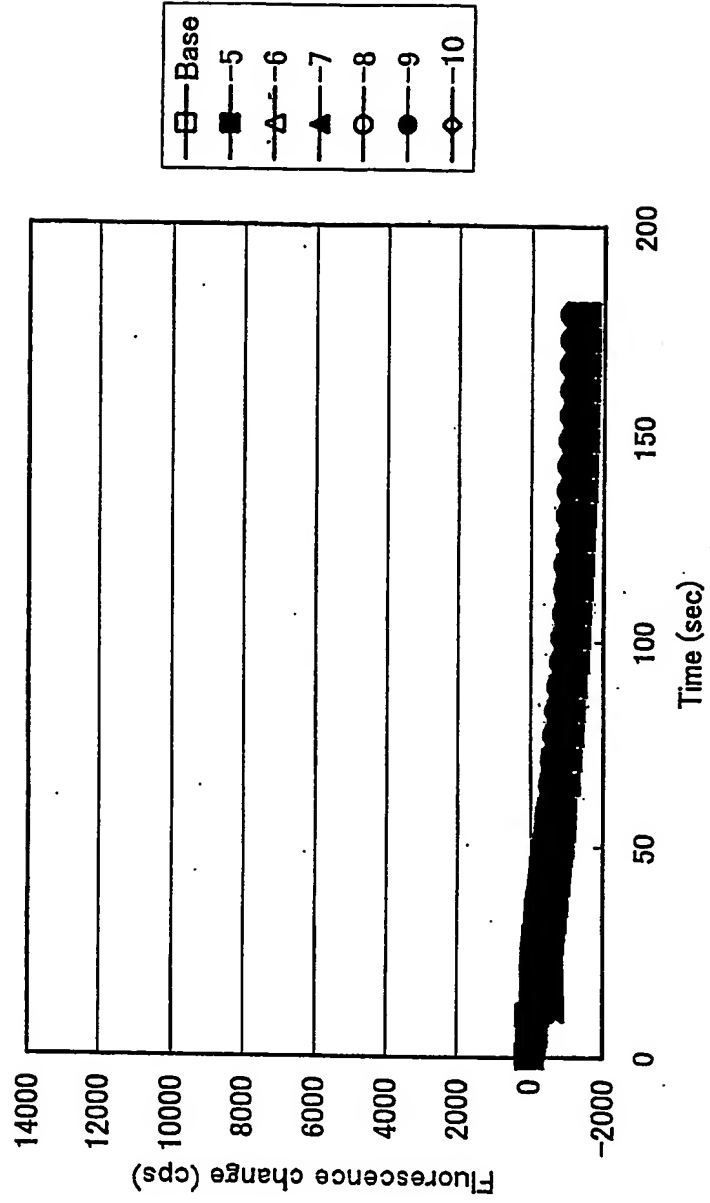
図 17



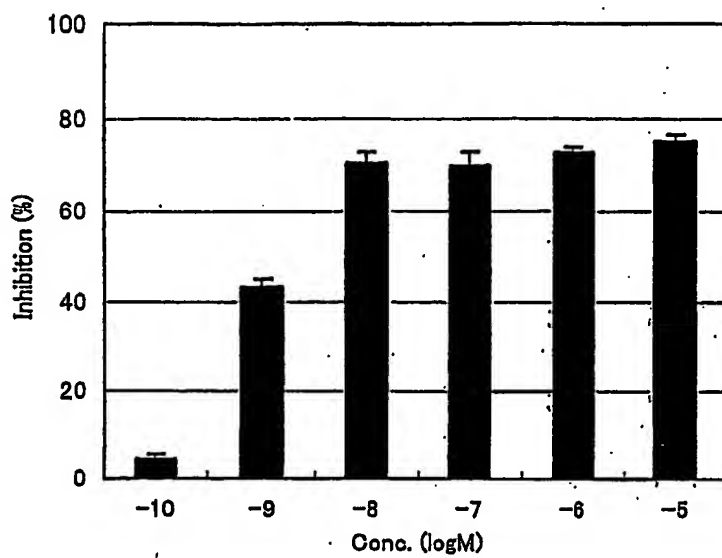


19/51

19

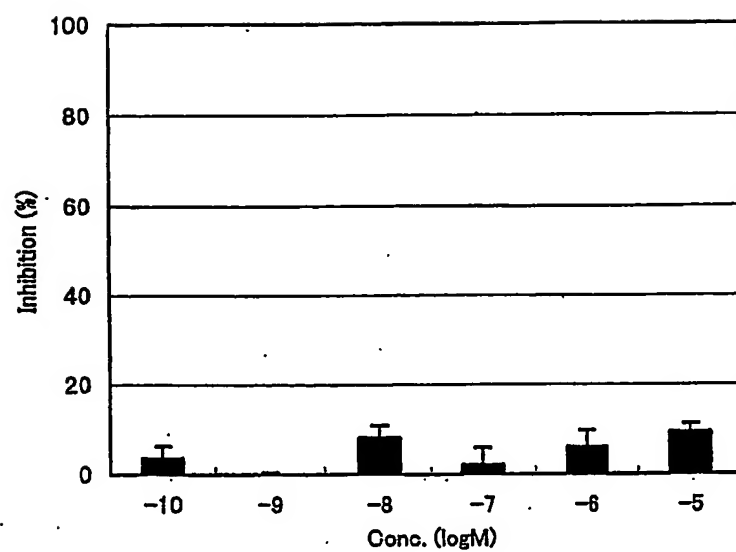


20



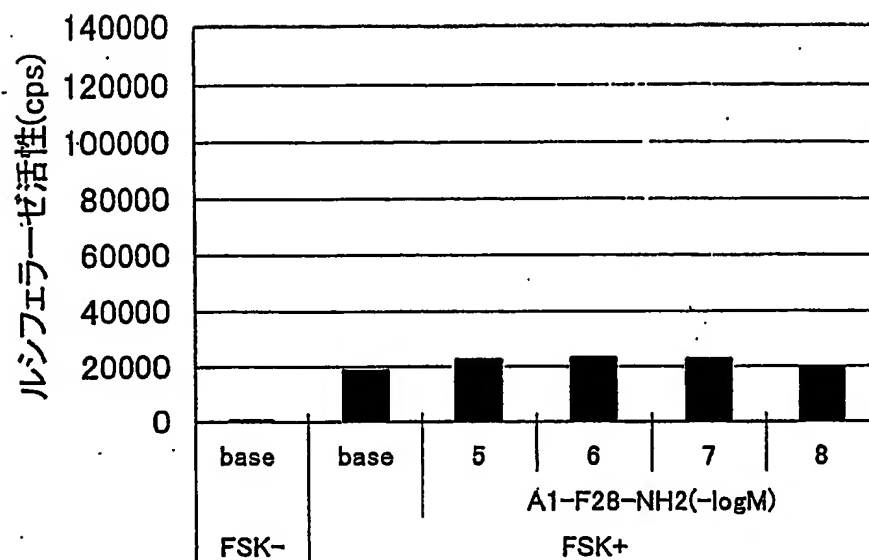
21/51

2 1



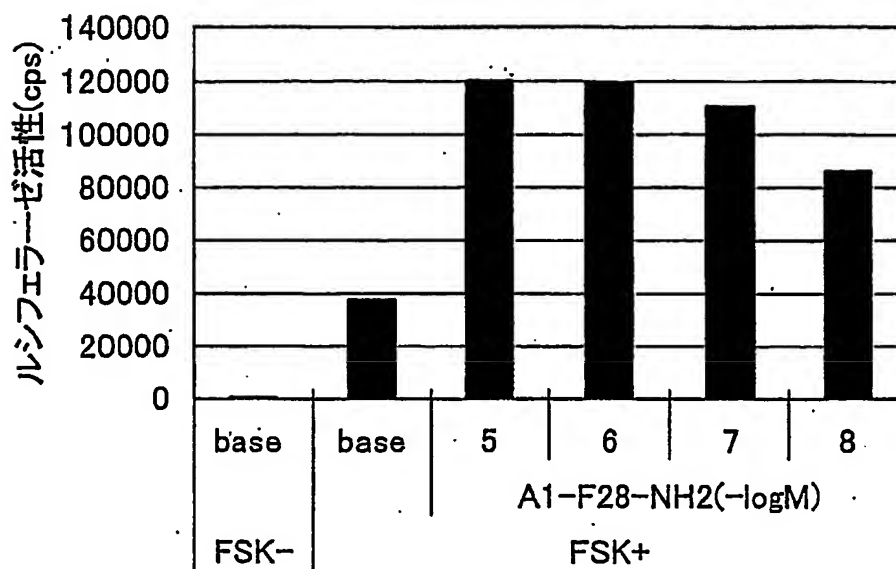
22/51

図 22



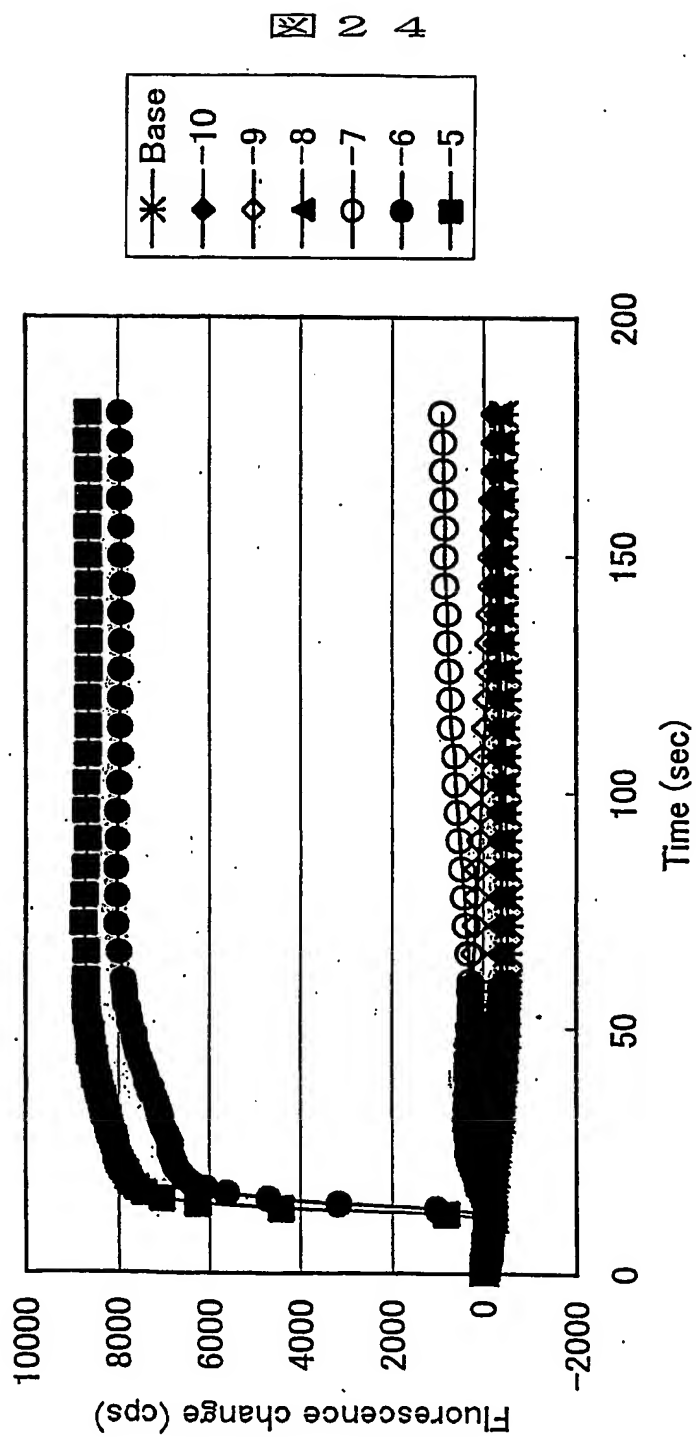
23/51

図 23

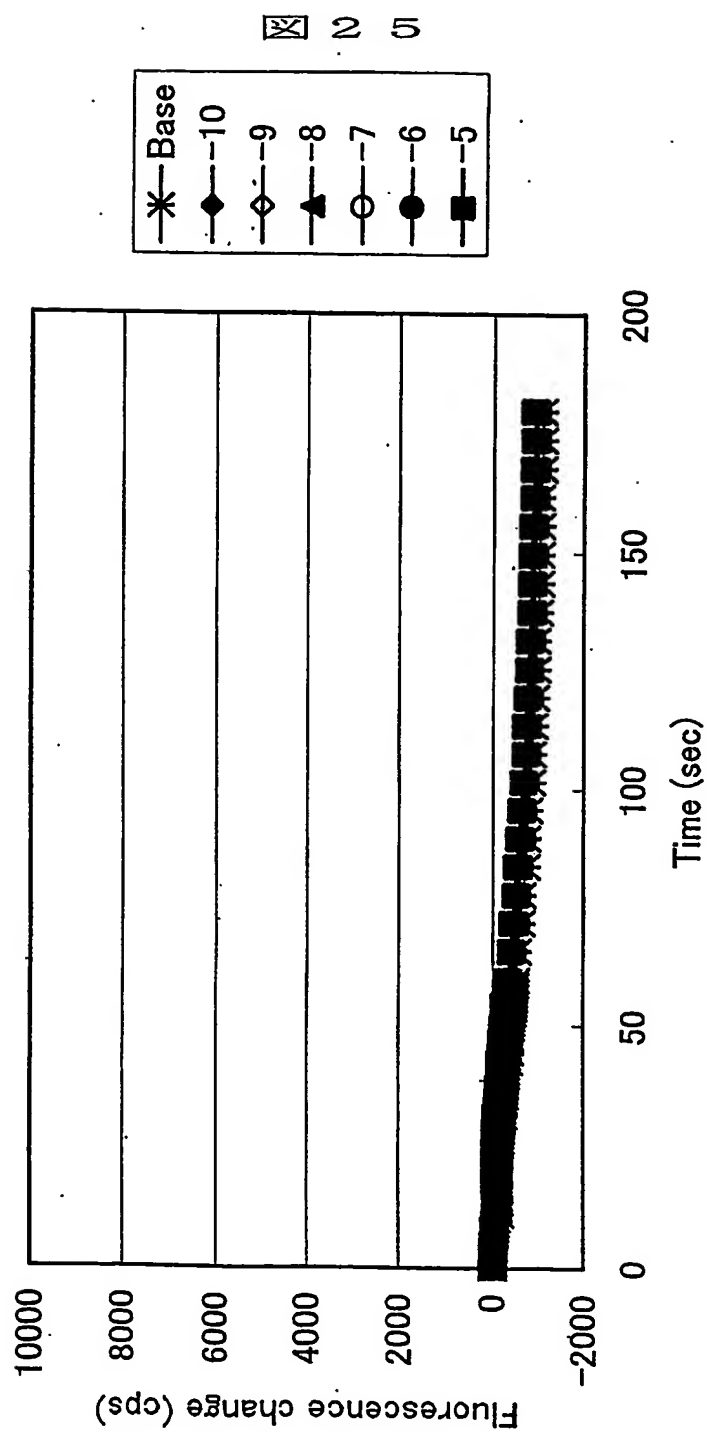




24/51

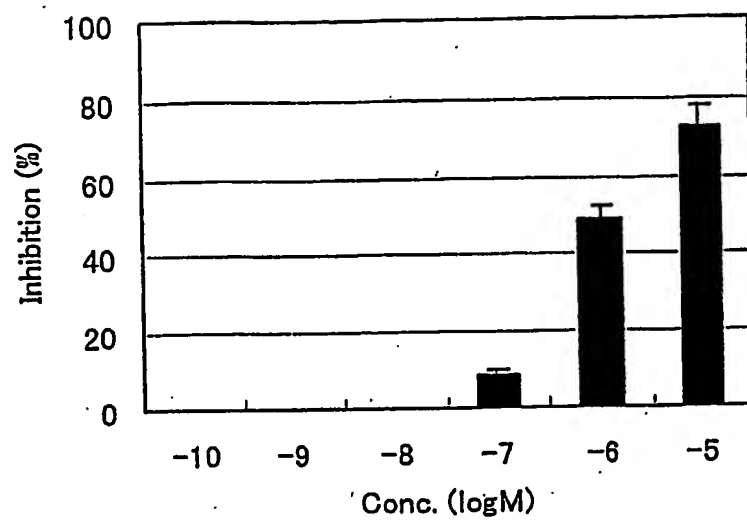


25/51



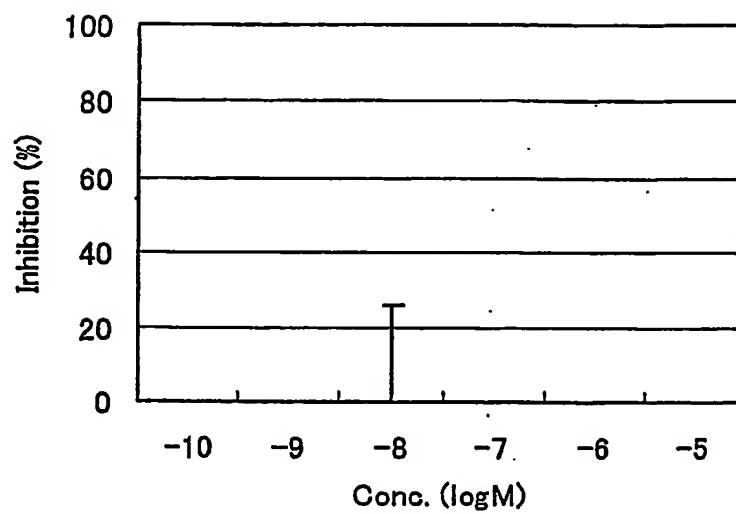
26/51

26



27/51

27



28/51


atgcgagacc cttaactccct gccctacctc ctgttcctgc ccctgggtgc ctgcttcccc 60  
gtgctggaca cagaggagacc tgtggatgcc gtagggggca cggacgtga aatgagctgg 120  
atggacccgg cgaggggacg cccctttccg tggggctccc ctgggtggcc gagagccccc 180  
taccacacacg ccc.tgctcgt cacggccaag gagctgcggg cgtcaggcaa ggcgcgtgct 240  
ggcttccagc tgcgtctcgg gaggcaggac gatggcagcg aggccactgg cctcctcctg 300  
ggggagggccg agaaggtggg gggcctgttg ggaacctgg ctgaggagct caatggctac 360  
agcaggaaaga agggggggctt cagcttccgc ttcggtcggc ggtga 405

☒ 2 00

29/51

29

Met	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ser	Leu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly
						5			10					15	
Ala	Cys	Phe	Pro	Val	Leu	Asp	Thr	Glu	Glu	Pro	Val	Asp	Ala	Val	Gly
						20			25					30	
Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Met	Ser	Trp	Met	Asp	Pro	Ala	Arg	Gly	Arg	Pro
						35			40					45	
Phe	Pro	Trp	Gly	Ser	Pro	Gly	Trp	Pro	Arg	Ala	Pro	Tyr	Pro	His	Ala
						50			55					60	
Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala	Arg	Ala
						65			70					75	80
Gly	Phe	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Arg	Gln	Asp	Asp	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr
						85			90					95	
Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr
						100			105					110	
Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Gly	Tyr	Ser	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly	Phe	Ser
						115			120					125	
Phe	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	End									
						130			135						



```

atgcaggcgc tcaacatcac cgcggagcag ttctcccggc tgctgagcgc gcacaacctg   60
actcgggagc agttcattca tcgctatggg ctgagaccgc tggctctacac tccggagctg   120
cccgcgcgtg ctaaagtggc ctttgcgctg gcaggagcac tcatttttgc cctggcgctc   180
ttcggaact ctctggatcat ctatgtggg accgcagca aggccatgcg caccgtcacc   240
aacatcttca tctgctctct ggcaactcagt gatctgctca ttgccttctt ctgcatcccc   300
gtcacgatgc tccagaacat ctccgacaag tggctgggtg gtgccttcat ctgcaagatg   360
gtaccctttg tccagtccac ggccgtcgtg acagaaatcc tcaccatgac ctgcatcgct   420
gttgagaggc accaaggact tgtccatcct tttaaaatga agtggcagta caccaccga   480
agggccttca cgatcttggg cgtgggtctg ttggcggcca tcacgtagg atcaccatg   540
tggcacgtgc aacgccttga gattaagtat gacttcctct atgaaaaga acacatctgc   600
tgcttgggaag aatgggccag ccccgtcac cagagaatct acagcacctt cattctcgtc   660
atcctcttcc tctgcctct tgttgtaatg ctatgcctct atagcaagat tggctatgaa   720
ctgtggatca agaagagagt gggagacagt tcagcgcttc aaactatcca cgggaaagaa   780
atgtccaaaa tagccaggaa gaagaagcgg gctgtcatta tgatgggtgac tgtggtggct   840
ctctttgctg catgctgggc acctttccac gttgttcaca tgatggttga gtacagtaat   900
tttgaaaaag aatatgatga tgtcacaatc aagatggtct ttgctgtcgc gcagacaatt   960
ggctttttca actccatctg taatcccttt gtgtatgcgt ttatgaatga aaacttcaaa  1020
aagaattttc tgtctgctgt ttgttattgc atagtgaag aatcctcctc ccagcacgg   1080
aagcctggga attctggaat atcaatgatg cagaagagag caaagttatc tcgaccacag   1140
cgtccagtgg aagaaaccaa aggagacaca ttcaatgatg ccagcattga tgtcaaatg   1200
tgcgagcagc cgcgggagaa aagacaactc aagagacagc tagccttctt cagttctgaa   1260
ctttctgaaa actctacttt tggtagtggc catgaactgt aa                       1302

```

31/51

3 1

```

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser
      5              10              15
Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg
      20              25              30
Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Val Ala Phe
      35              40              45
Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser
      50              55              60
Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr
      65              70              75              80
Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe
      85              90              95
Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu
      100             105             110
Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala
      115             120             125
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His
      130             135             140
Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg
      145             150             155             160
Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val
      165             170             175
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe
      180             185             190
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro
      195             200             205
Val His Gln Arg Ile Tyr Ser Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu
      210             215             220
Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu
      225             230             235             240
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile
      245             250             255
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val
      260             265             270
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro
      275             280             285
Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu
      290             295             300
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile
      305             310             315             320
Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn
      325             330             335
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val
      340             345             350
Lys Glu Ser Ser Ser Pro Ala Arg Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser
      355             360             365
Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Pro Gln Arg Pro Val Glu
      370             375             380
Glu Thr Lys Gly Asp Thr Phe Ser Asp Ala Ser Ile Asp Val Lys Leu
      385             390             395             400
Cys Glu Gln Pro Arg Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe
      405             410             415
Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu
      420             425             430
Leu End

```



32/51

 3 2

```

atgcaggcgc tcaacatcac cgcggagcag ttttccggc tgctgagcgc gcacaacctg 60
actcgggaac agttcattca tcgctatggg ctgcgaccgc tggctctacac tccggagctg 120
cccgcgcgcg ctaaactggc ctttgcgctg gctggagcac tcatttttgc cctggcgctc 180
tttggcaact ctctggtcat ctatgtggtg acccgagca aggccatgcg cacogtcacc 240
aacatcttca tctgctctct ggcaactcagt gatctgctca ttgccttctt ctgcatcccc 300
gtcacgatgc tccagaacat ctccgacaag tggctgggtg gtgccttcat ctgcaagatg 360
gtgcccttcg tccagtccac tgctgttggt acggaaatcc tcaccatgac ttgcatcgct 420
gttgagagga accaaggact catccatcct tttaaaatga agtggcagta cactaccga 480
agggctttca caatcttggg tgtggtctgg ttggcagcca tcatcgtagg atcacccatg 540
tggcacgtac aacgcctcga gattaagtat gacttcctct atgagaaaga acatgtctgc 600
tgtttggaag agtgggcccag ccccatgcac cagagaatct acaccacctt catcctcgtc 660
atcctcttcc tcctgccgct tgtggtgatg cttgtcctct acagcaagat tggctatgaa 720
ctgtggatca agaagagagt tggagacagt tcagcacttc agactatcca cgggaaagaa 780
atgtccaaaa tagccaggaa gaagaagcgg gctgtcgtaa tgatggtgac agtgggtggct 840
ctcttcgctg cgtgctgggc acctttccat gttgttcaca tgatggttga gtacagtaac 900
tttgaaaaag agtatgatga tgtcacaatc aagatggttt ttgctgttgc acaaacaatt 960
ggotTTTTca actccatctg taatcccttt gtgtatgcat ttatgaatga aaacttcaaa 1020
aagaatTTTT tgtctcggtt ttgttattgc atagtaagag aaaccttctc ccaggacag 1080
aagcctggaa attctgggat ttcaatgatg caaaagagag caaagttatc acgatcacag 1140
cgtccagtgg cggaagccaa aggagactta ttcagcgatg ccaacgttga tgtcaaattg 1200
tgtgagcagc caggggagaa aaggcaactc aagcgacagc ttgccttctt tagttctgaa 1260
ctttctgaaa actctacttt cggcagtgga catgaactgt aatatcgatg a 1311

```

33/51

33

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser  
 5 10 15  
 Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg  
 20 25 30  
 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Leu Ala Phe  
 35 40 45  
 Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser  
 50 55 60  
 Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe  
 85 90 95  
 Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu  
 100 105 110  
 Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala  
 115 120 125  
 Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His  
 130 135 140  
 Gln Gly Leu Ile His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val  
 165 170 175  
 Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe  
 180 185 190  
 Leu Tyr Glu Lys Glu His Val Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro  
 195 200 205  
 Met His Gln Arg Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu  
 210 215 220  
 Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile  
 245 250 255  
 His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val  
 260 265 270  
 Val Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro  
 275 280 285  
 Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu  
 290 295 300  
 Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile  
 305 310 315 320  
 Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn  
 325 330 335  
 Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val  
 340 345 350  
 Arg Glu Thr Phe Ser Pro Gly Gln Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser  
 355 360 365  
 Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Ser Gln Arg Pro Val Ala  
 370 375 380  
 Glu Ala Lys Gly Asp Leu Phe Ser Asp Ala Asn Val Asp Val Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Cys Glu Gln Pro Gly Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe  
 405 410 415  
 Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu  
 420 425 430  
 Leu End Tyr Arg End  
 435

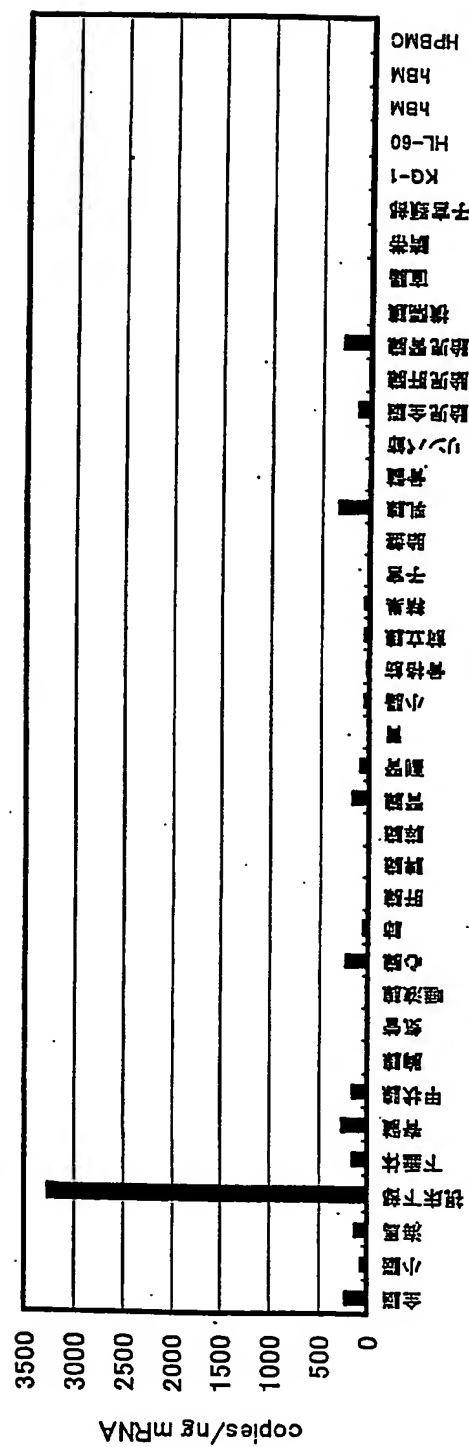
34/51

1 M Q A L N I T P E Q F S R L L R D H N L T R E Q F I A L Y R L R P L V Y T P E L P P G R A K L A L V L A  
 1 M Q A L N I T A E Q F S R L L S A H N L T R E Q F I H R Y G L R P L V Y T P E L P A R A K V A F A L B  
 1 M Q A L N I T A E Q F S R L L S A H N L T R E Q F I H R Y G L R P L V Y T P E L P A R A K L A F A L C  
  
 51 T G V L I F A L A L F G N A L V F Y V V T R S K A M R T V T N I F I C S L A L S D L L I T F F C I P A  
 51 A G A L I F A L A L F G N S L V I Y V V T R S K A M R T V T N I F I C S L A L S D L L I A F F C I P B  
 51 A G A L I F A L A L F G N S L V I Y V V T R S K A M R T V T N I F I C S L A L S D L L I A F F C I P C  
  
 101 V T M L Q N I S D N W L G G A F I C K M V P F V Q S T A V V T E I L T M T C I A V E R H Q G L V H P A  
 101 V T M L Q N I S D K W L G G A F I C K M V P F V Q S T A V V T E I L T M T C I A V E R H Q G L V H P B  
 101 V T M L Q N I S D K W L G G A F I C K M V P F V Q S T A V V T E I L T M T C I A V E R H Q G L I H P C  
  
 151 F K M K W Q Y T N R R A F T M L G V V W L V A V I V G S P M W H V Q Q L E I K Y D F L Y E K E H I C A  
 151 F K M K W Q Y T T R R A F T I L G V V W L A A I I V G S P M W H V Q R L E I K Y D F L Y E K E H I C B  
 151 F K M K W Q Y T T R R A F T I L G V V W L A A I I V G S P M W H V Q R L E I K Y D F L Y E K E H I C C  
  
 201 C L E E W T S P V H Q K I Y T T F I L V I L F L L P L M V M L I L Y S K I G Y E L W I K K R V G D G A  
 201 C L E E W A S P V H Q R I Y S T F I L V I L F L L P L V M L V L Y S K I G Y E L W I K K R V G D S B  
 201 C L E E W A S P M H Q R I Y T T F I L V I L F L L P L V M L V L Y S K I G Y E L W I K K R V G D S C  
  
 251 S V L R T I H G K E M S K I A R K K K R A V I M M V T V A L F A V C W A P F H V V H M M I E Y S N A  
 251 S A L Q T I H G K E M S K I A R K K K R A V I M M V T V A L F A A C W A P F H V V H M M V E Y S N B  
 251 S A L Q T I H G K E M S K I A R K K K R A V I M M V T V A L F A A C W A P F H V V H M M V E Y S N C  
  
 301 F E K E Y D D V T I K M I F A I V Q I I G F S N S I C N P I V Y A F M N E N F K K N V L S A V C Y C A  
 301 F E K E Y D D V T I K M V F A V A Q T I G F F N S I C N P F V Y A F M N E N F K K N F L S A V C Y C B  
 301 F E K E Y D D V T I K M V F A V A Q T I G F F N S I C N P F V Y A F M N E N F K K N F L S A V C Y C C  
  
 351 I V N K T F S P A Q R H G N S G I T M M R K K A K F S L R E N P V E E T K G E A F S D G N I E V K L A  
 351 I V K E S S P A R K P G N S G I S M M Q K R A K L S R P Q R P V E E T K G D T F S D A S I D V K L B  
 351 I V R E T F S P G Q K P G N S G I S M M Q K R A K L S R S Q R P V A E A K G D L F S D A N V D V K L C  
  
 401 C E Q T E K K K L K R H L A L F R S E L A E N S P L D S G H A  
 401 C E Q P R E K R Q L K R Q L A F F S S E L S E N S T F G S G H E L B  
 401 C E Q P G E K R Q L K R Q L A F F S S E L S E N S T F G S G H E L C

差替え用紙(規則26)

35/51

35



36/51

图 3 6

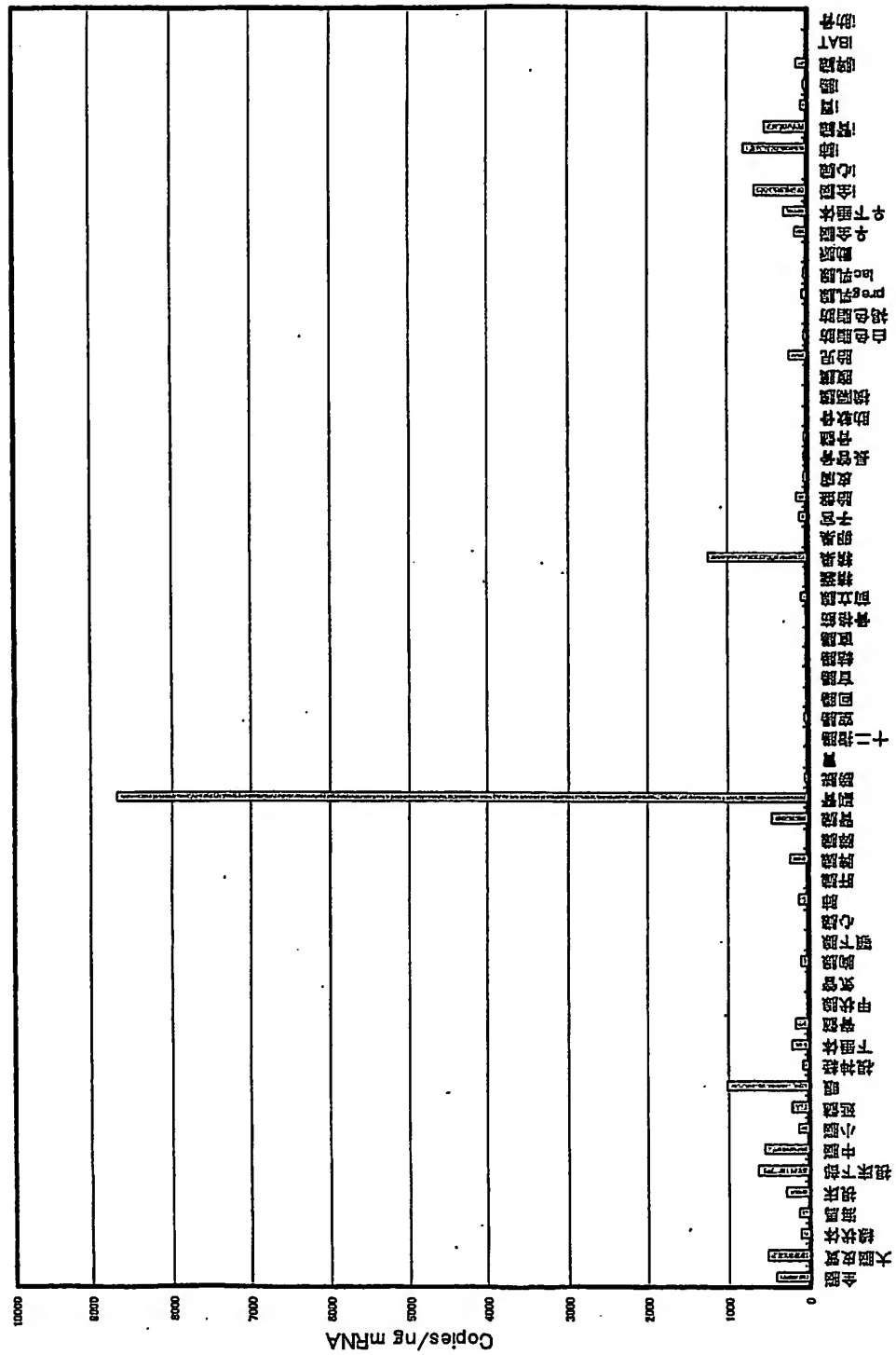


图 3-7

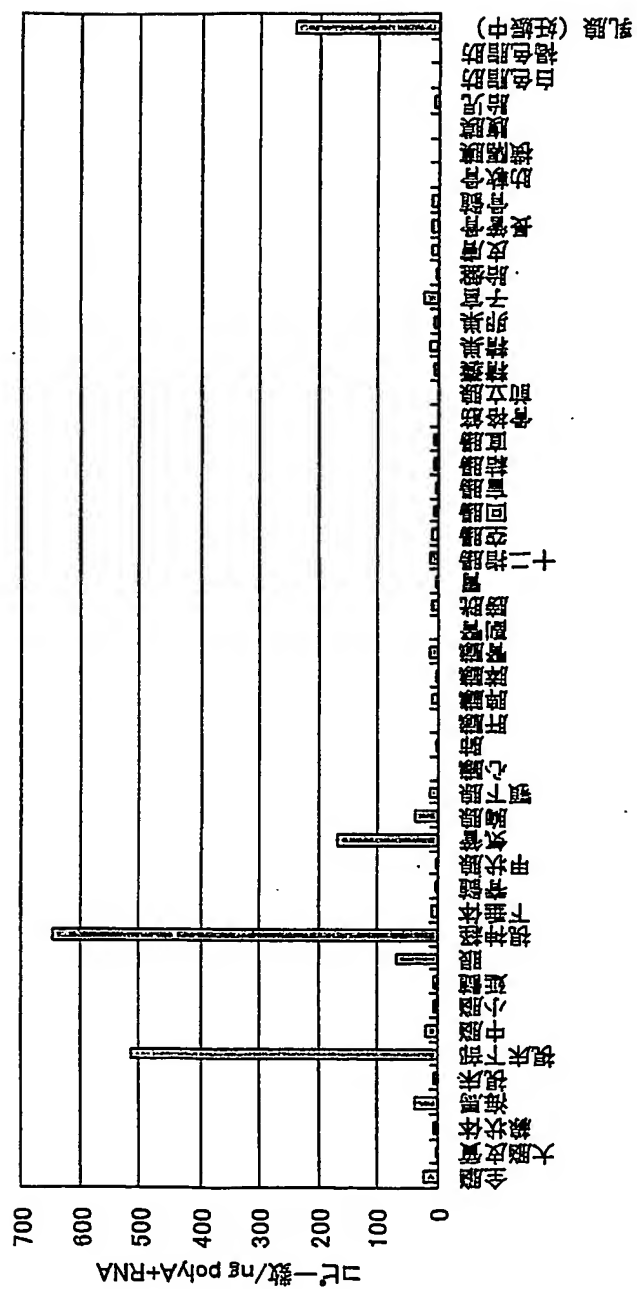
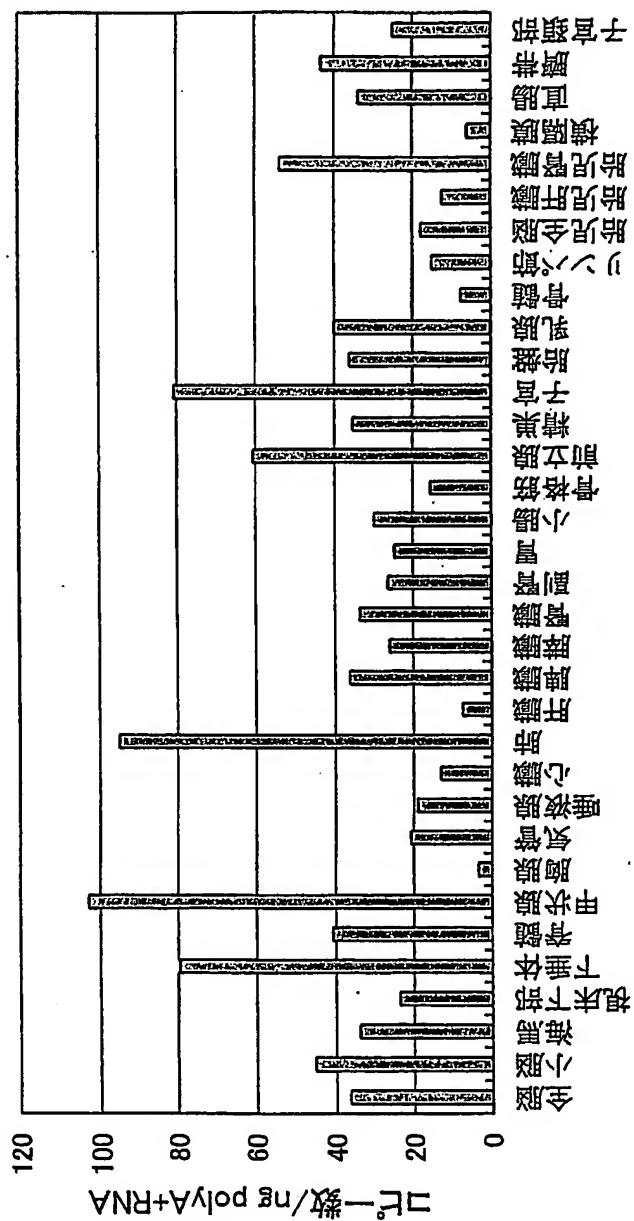


図 38



 39

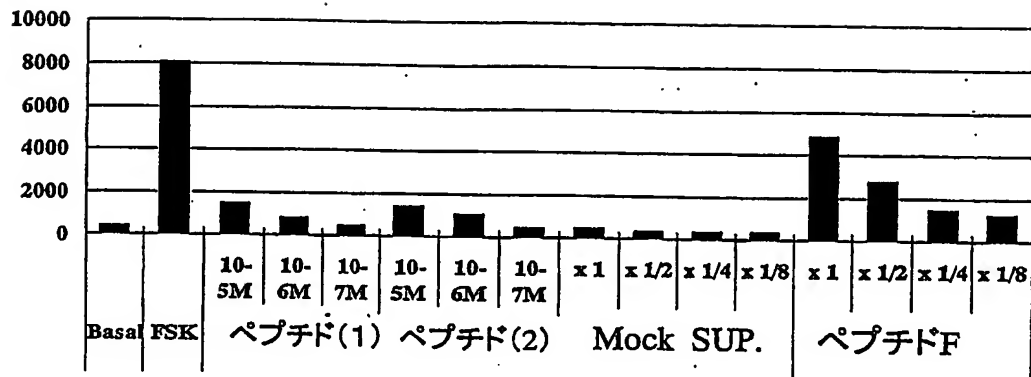
略称	名称	AQ27	分泌蛋白質G
Pir	梨状皮質	+++	
CxA	皮質扁桃移行帯	+++	
VP	淡蒼球	++	
BSTMA	分界条床核、内側、前部	+	
BSTLP	分界条床核、外側、後部	+	
BSTLV	分界条床核、外側、腹部	+	
LPO	視索前野	++	
VLPO	腹外側視索前野核	+	
ADP	前背側視索前野核	+	
VMPO	腹内側視索前野核	+	
MPOM	内側視索前野核部、中央部	+	
AHA	視床下部前野、前部	+	
AHC	視床下部前野、中心部	+	
AHP	視床下部前野、後部	+	
MCPO	大細胞性視索前野核	++	
PaAP	視床下部室傍核、小細胞域	+	
PaDC	視床下部室傍核、背幅域	++	
PVA	視床室傍核、前部	+	
PVP	視床室傍核、後部	+	
VMHC	視床下部腹内側核、中心部	+	
VMHDM	視床下部腹内側核、背内側部	+	
VMHVL	視床下部腹内側核、腹外側部	++	
ZI	不確帯	++	
RCh	視交叉後野	+	+++
ArcD	弓状核、背側部	+	++
ArcM	弓状核、内側部	+	
ArcL	弓状核、外側部	+	+
ArcMP	弓状核、内側後部	++	
PH	視床下部後核	++	
LH	外側視床下部域	+	
MPT	視蓋前域内側核	+	
IGL	膝状体間小葉	+++	
M1	一次運動皮質	+	
M2	二次運動皮質	+	
Cg1	帯状皮質、領域1	+	
Cg2	帯状皮質、領域2	+	
MeAD	扁桃体内側核、前背側部	+	
MZMG	内側膝状周辺帯	++	
DMPAG	中脳中心灰白質背内側部	++	
LPAG	中脳中心灰白質外側部	+	
VLPA	中脳中心灰白質腹外側部	+	
BIC	下丘腕核	++	
DRD	背側縫線核、背側域	+++	
DRV	背側縫線核、腹側域	+++	
PPTg	脚橋被蓋核	+	
DRC	背側縫線核、尾側域	+++	
LDTg	被蓋外背側核	++	
PPy	錐体傍核	+	
LC	青斑核	+++	
GGA	中心灰白質、 $\alpha$ 域	+++	
CGB	中心灰白質、 $\beta$ 域	+++	
Sol	孤束核	+	



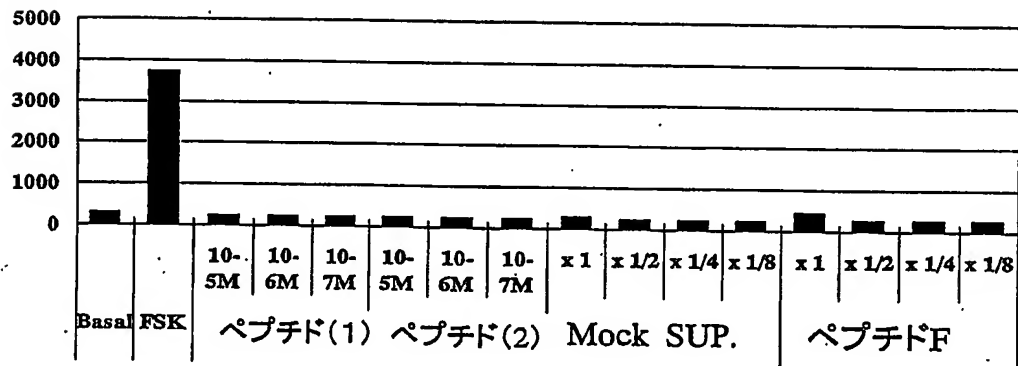
40/51

図 4 O

## AQ27/HEK



## pAKKO/HEK



41/51

Figure 4 1

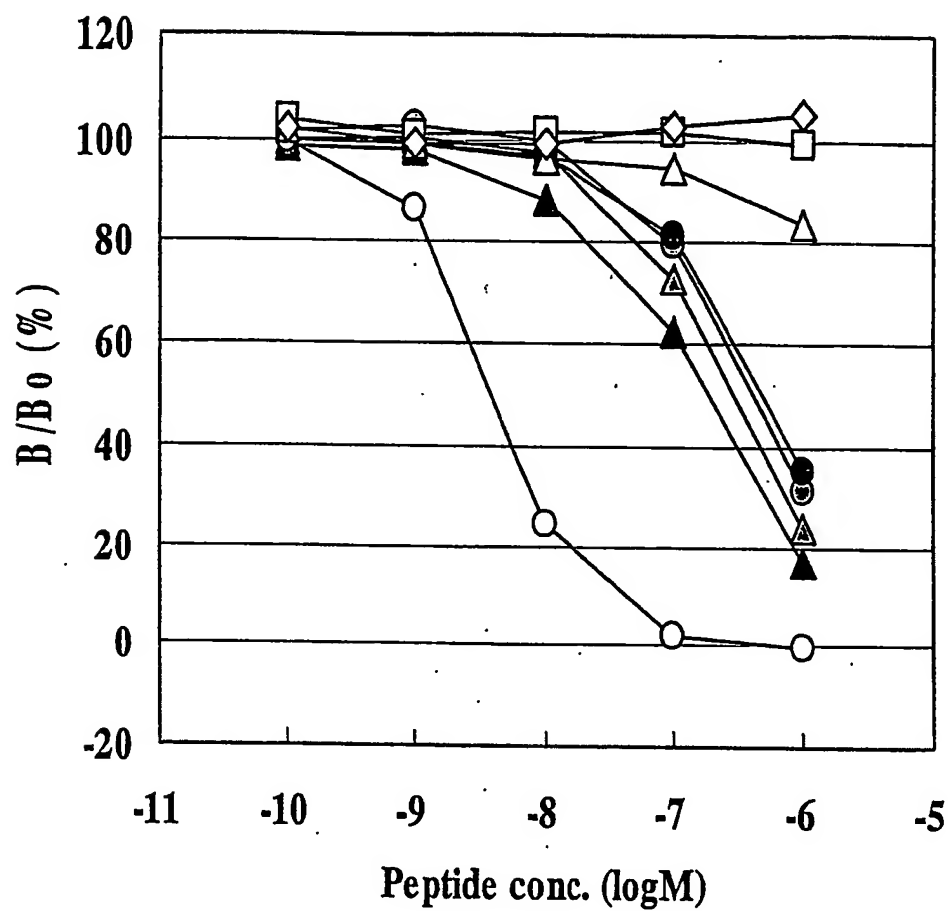
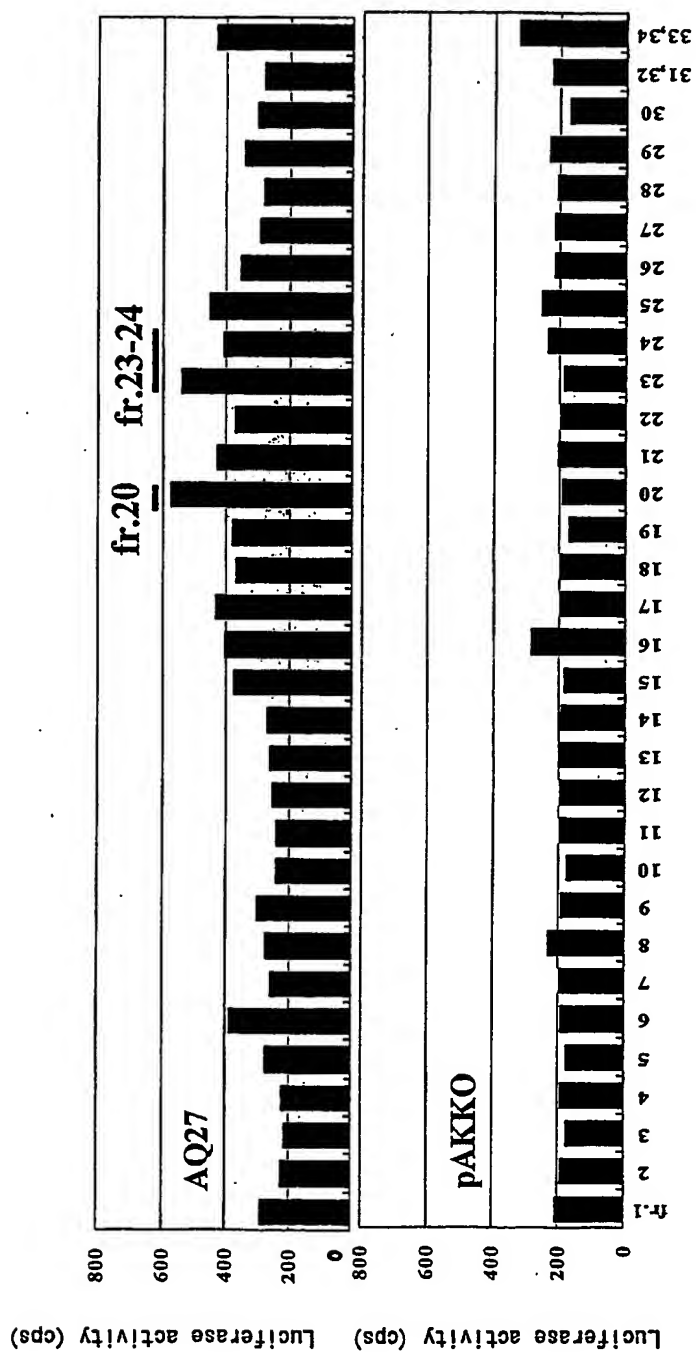
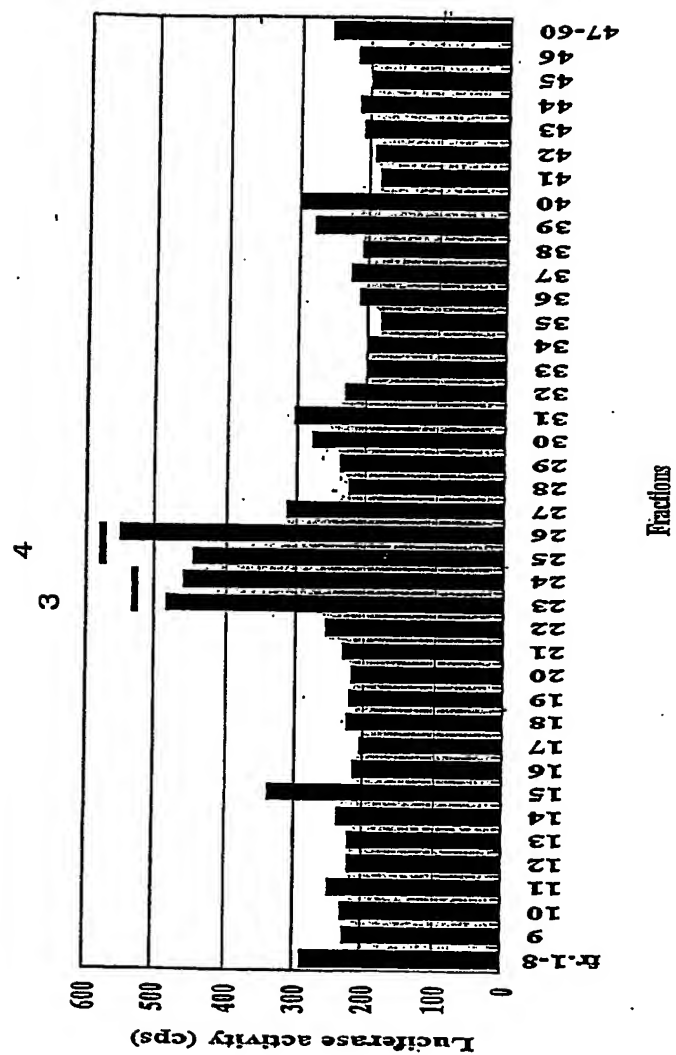


図 4 2



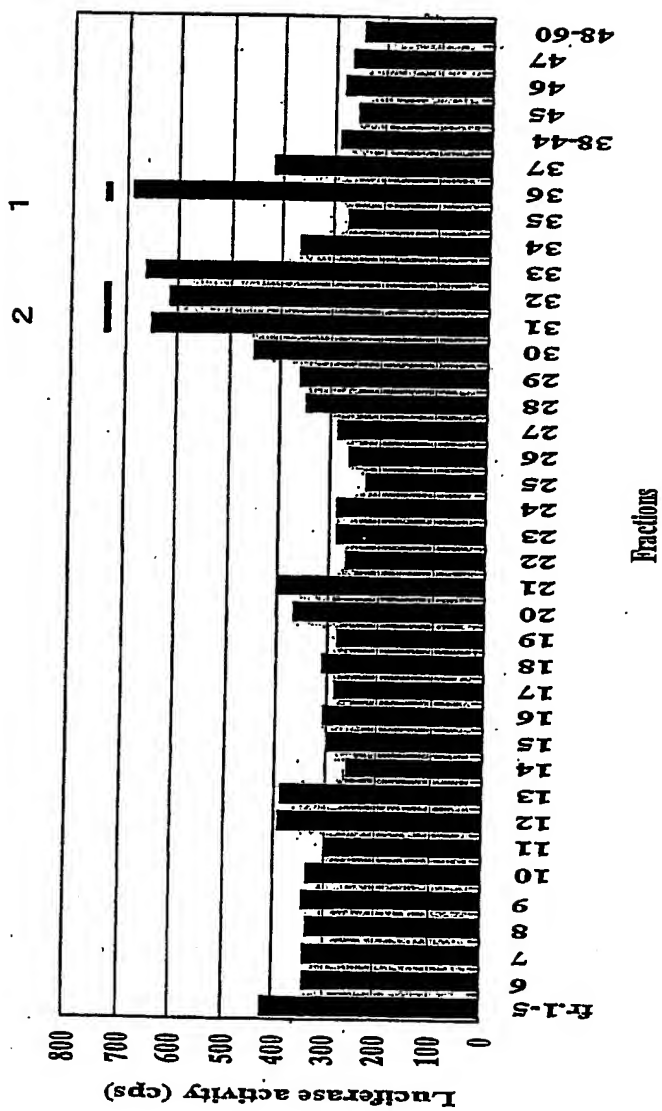
43/51

4 3



44/51

4 4



45/51

☒ 4 5

アミノ酸配列

ピーク 分子量  
番号 測定値/理論値

1: 4505.7/4505.0 Pyr-DEGSEATIGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEEELNGYSRKKGGSFRF-NH<sub>2</sub> (437≡/酸)

2: 4678.3/4678.2 RQDEGSEATIGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEEELNGYSRKKGGSFRF-NH<sub>2</sub> (447≡/酸)  
4277.9/4278.8 EGSEATIGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEEELNGYSRKKGGSFRF-NH<sub>2</sub> (417≡/酸)

3: 3217.3/3218.6 AGEKTSGLPLGNLAEEELNGYSRKKGGSFRF-NH<sub>2</sub> (307≡/酸)

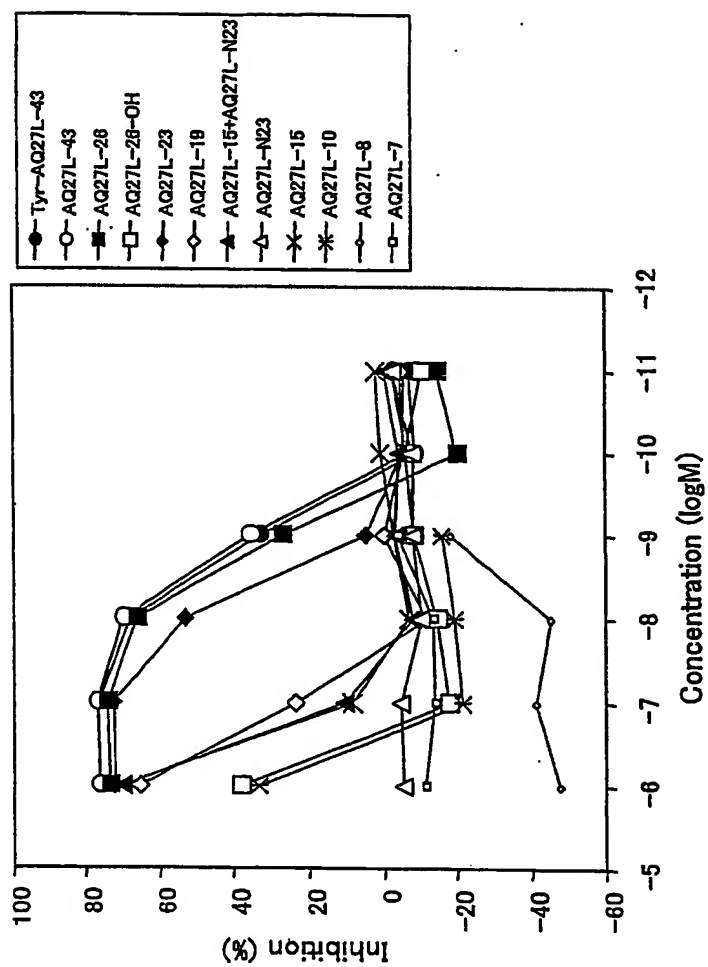
4: 2731.9/2732.1 SCPLGNLAEEELNGYSRKKGGSFRF-NH<sub>2</sub> (257≡/酸)

46/51



Name	Sequence	EC <sub>50</sub> (nM)
Tyr-AQ27L-43	YQDEGSEATGFLPAAGEKTSGLGNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	3.2
AQ27L-43	pQDEGSEATGFLPAAGEKTSGLGNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	2.7
AQ27L-26	TSGLGNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	3.9
AQ27L-26-OH	TSGLGNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF OH	>1000
AQ27L-23	PLGNLAEEELNGYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	8.9
AQ27L-19	LAEEELNGYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	440
AQ27L-15	LNYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	480
AQ27L-N23	pQDEGSEATGFLPAAGEKTSGLGNLAEE	Not detected
AQ27L-15+AQ27L-N23	pQDEGSEATGFLPAAGEKTSGLGNLAEE+ LNYSRKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	460
AQ27L-10	RKKGGFSFRF <sup>NH2</sup>	>1000
AQ27L-8	KGGFSFRF <sup>NH2</sup>	>1000
AQ27L-7	GGFSFRF <sup>NH2</sup>	>1000

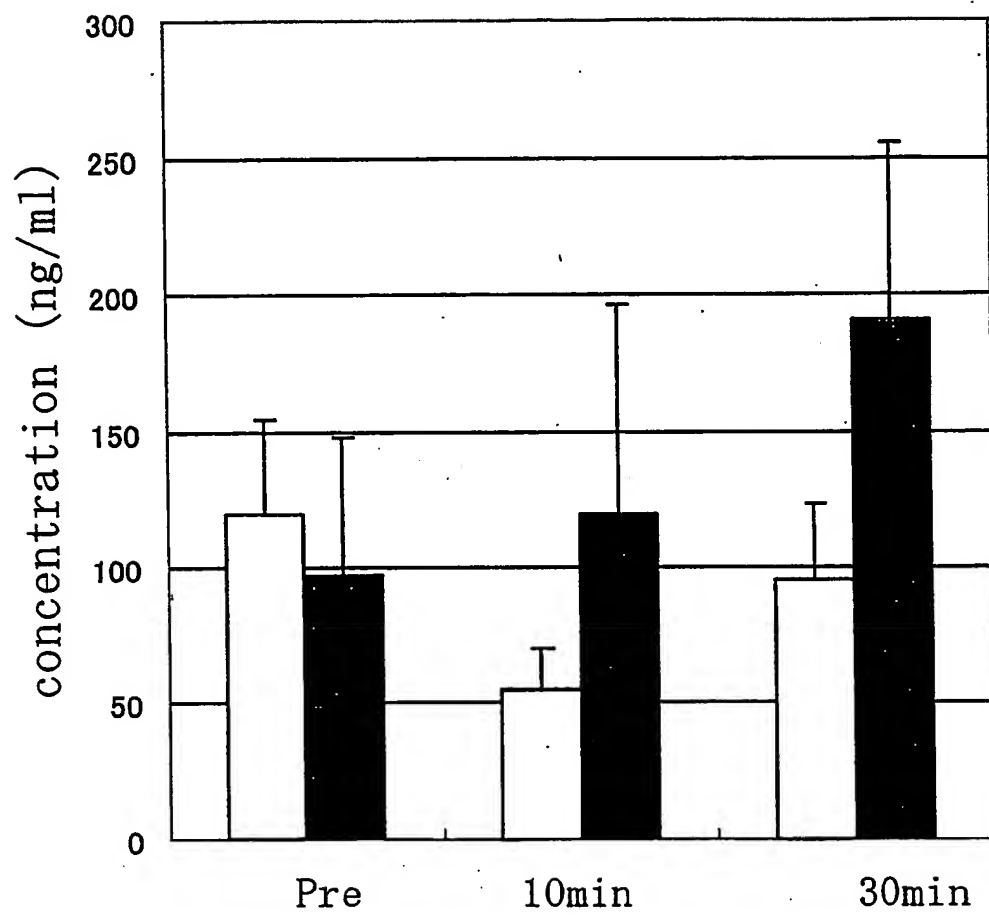
图 4-7





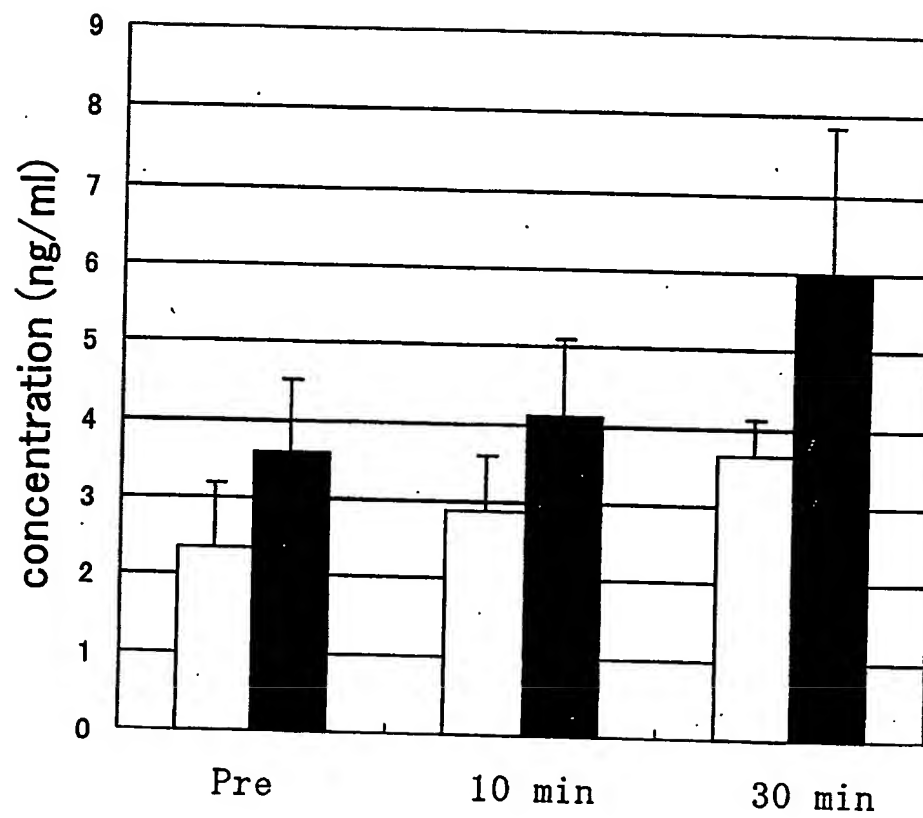
48/51

☒ 4 8



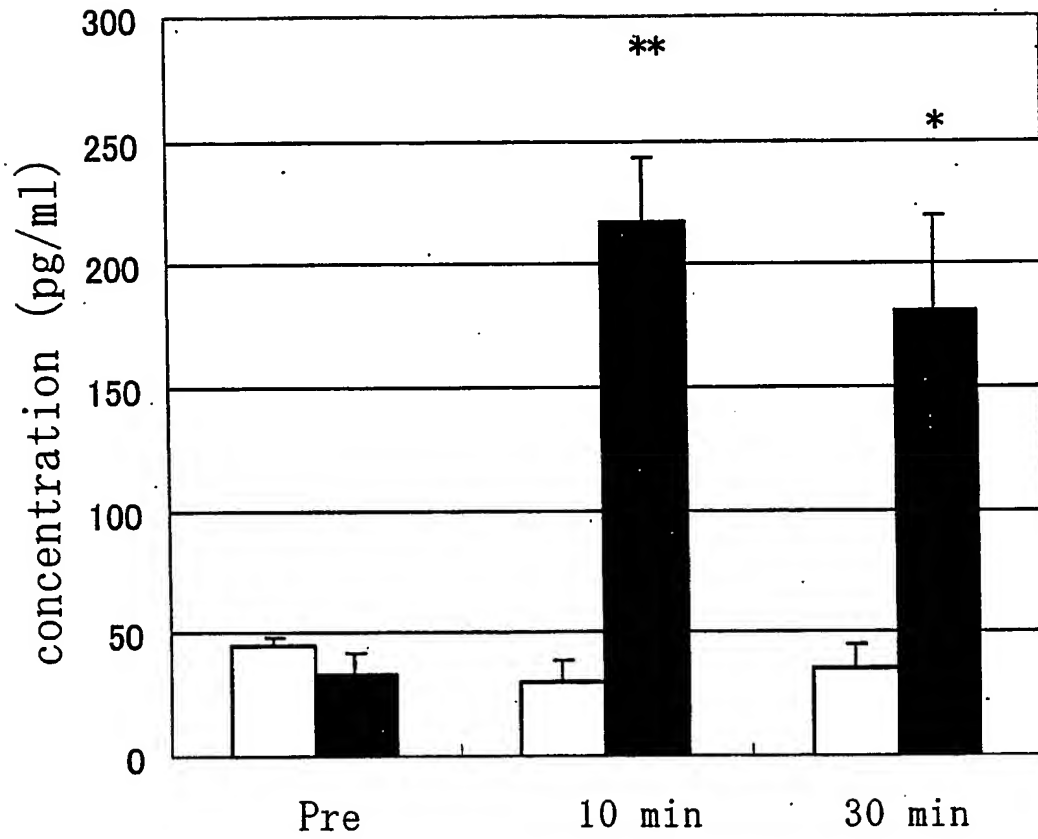
49/51

49



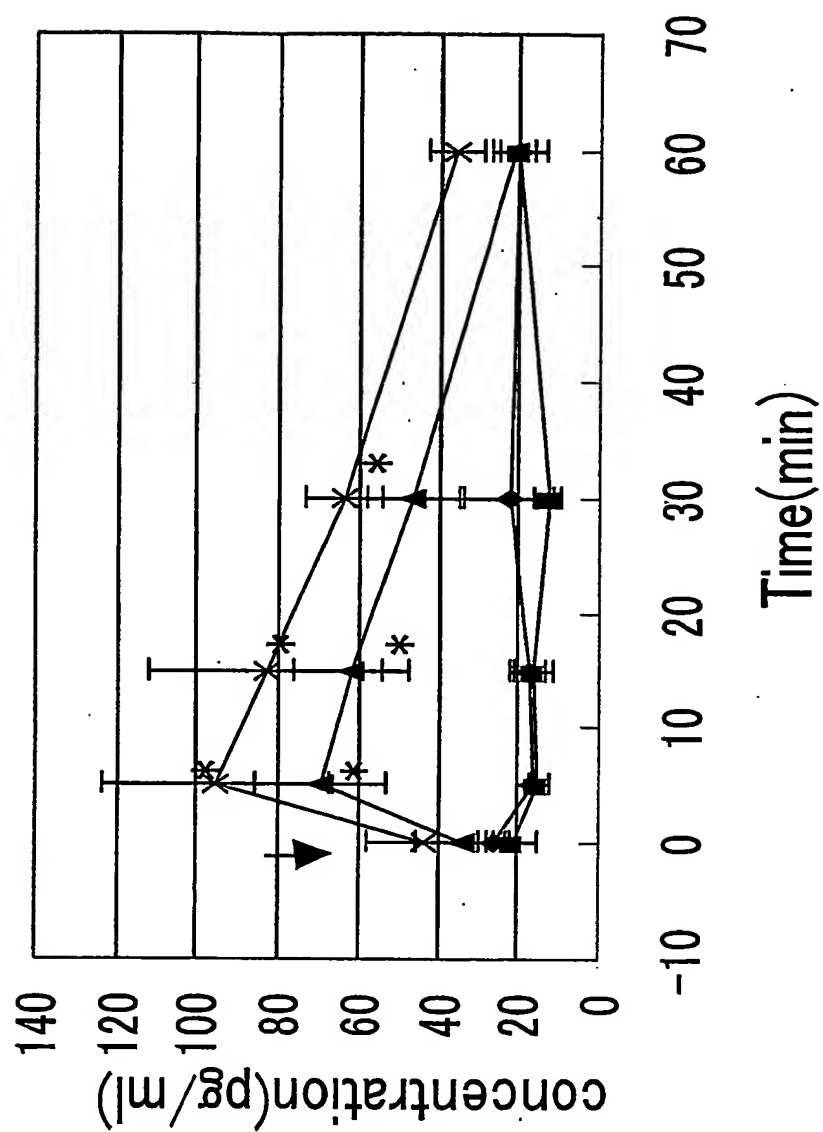
50/51

図 50



51/51

図 5 1



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; An Agent for Modulating Secretion of Adrenocortical Hormones

&lt;130&gt; 3090WOOP

&lt;150&gt; JP 2002-256522

&lt;151&gt; 2002-09-02

&lt;150&gt; JP 2003-55104

&lt;151&gt; 2003-03-03

&lt;160&gt; 38

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Val Arg Pro Tyr Pro Leu Ile Tyr Phe Leu Phe Leu Pro Leu Gly

5

10

15

Ala Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Glu Pro Thr Asp Ala Met Gly

20

25

30

Gly Leu Gly Ala Gly Glu Arg Trp Ala Asp Leu Ala Met Gly Pro Arg

35

40

45

Pro His Ser Val Trp Gly Ser Ser Arg Trp Leu Arg Ala Ser Gln Pro

50

55

60

Gln Ala Leu Leu Val Ile Ala Arg Gly Leu Gln Thr Ser Gly Arg Glu

65

70

75

80

His Ala Gly Cys Arg Phe Arg Phe Gly Arg Gln Asp Glu Gly Ser Glu

85

90

95

Ala Thr Gly Phe Leu Pro Ala Ala Gly Glu Lys Thr Ser Gly Pro Leu

100

105

110

2/22

Gly Asn Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Lys Gly Gly

115

120

125

Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg Arg

130

135

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 408

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

atggttaaggc cttacccccct gatctacttc ctcttctctgc cgttgggcgc ctgcttccct   60
ctactggaca gaagagagcc cacagacgcc atgggtggcc tcggagctgg agaacgctgg   120
gccgacctgg ccatggggcc ccgacccac tccgtgtggg gttcctctcg gtggctgaga   180
gcttcacagc cacagccct gcttgtcata gccagggggc tgcagacatc gggcagagag   240
catgctggct gcagattccg cttcgggagg caggacgaag gcagtgaggc caccggcttc   300
ctccctgctg cgggggagaa gaccagcggc ccgttaggga acctggctga ggagctcaat   360
ggctacagca ggaagaaagg cggcttcagc ttccgcttcg gtcggcgg               408

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 3

Met Arg Cys Leu Cys Ser Trp Leu Cys Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala

5

10

15

Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile

20

25

30

Gly Ala Arg Met Ser Trp Val Gln Leu Thr Glu Gly His Thr Pro Arg

35

40

45

Ser Val Gln Ser Pro Arg Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Lys Glu

3/22

50                      55                      60  
 Gln Gln Ala Ser Arg Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln  
 65                      70                      75                      80  
 Asp Ser Gly Ser Glu Ala Thr Gly Phe Leu Pro Thr Asp Ser Glu Lys  
                     85                      90                      95  
 Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser  
                     100                      105                      110  
 Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg  
                     115                      120

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 4

atgaggtgcc tctgctcttg gctttgcctc ctctgcctc tgagtgcctg ctttcctctg 60  
 ctggacagaa ggggaccac agacatcggt gacatcggag ccagaatgag ctgggtccag 120  
 ctgactgagg gacacacccc ccgctcagtt caaagtccac ggccacaggc cctgctcgtg 180  
 gtggccaagg agcagcaggc ctctcgcagg gagcacactg gcttcctgtt agggaggcag 240  
 gacagtggca gtgaagccac ggggttcctg cccactgact cagagaaggc cagcggcccc 300  
 ctggggactc tggcagagga gctcagcagc tacagccggc ggaaggaggagg cttcagcttc 360  
 cgcttcggcc gg 372

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 5

Met Arg Gly Phe Arg Pro Leu Leu Ser Leu Leu Pro Leu Ser Ala  
                     5                      10                      15

4/22

Cys Phe Pro Leu Leu Asp Arg Arg Gly Pro Thr Asp Ile Gly Asp Ile  
                     20                    25                    30  
 Gly Ala Arg Met Asn Trp Ala Gln Leu Ala Glu Gly His Pro Pro Asn  
                     35                    40                    45  
 Ser Val Gln Asn Pro Gln Pro Gln Ala Leu Leu Val Val Ala Arg Glu  
                     50                    55                    60  
 Gln Gln Ala Ser His Arg Glu His Thr Gly Phe Arg Leu Gly Arg Gln  
                     65                    70                    75                    80  
 Asp Gly Ser Ser Glu Ala Ala Gly Phe Leu Pro Ala Asp Ser Glu Lys  
                     85                    90                    95  
 Ala Ser Gly Pro Leu Gly Thr Leu Ala Glu Glu Leu Ser Ser Tyr Ser  
                     100                    105                    110  
 Arg Arg Lys Gly Gly Phe Ser Phe Arg Phe Gly Arg  
                     115                    120                    124

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 6

atgaggggct tccggccttt gctttcccta cttctccctc tgagtgcctg ctttcccctg 60  
 ctggacagaa ggggaccac agacatcggt gacatcggag ccaggatgaa ctggggccag 120  
 ctggctgagg gacatcccc caactcggtt caaaatccac agccacaggc cctgcttggtg 180  
 gtggccaggg agcagcaggc ctcccacagg gagcacaccg gcttccgtct agggaggcaa 240  
 gacggtagca gtgaggccgc agggttcctg cccgccgact cggagaaggc cagcggccct 300  
 ctggggactc tggcagagga gctgagcagc tacagccgga ggaaggagg cttcagcttc 360  
 cgctttggac gg 372

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 134



5/22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 7

Met Arg Ser Pro Tyr Ser Leu Pro Tyr Leu Leu Phe Leu Pro Leu Gly  
                     5                                10                                15  
 Ala Cys Phe Pro Val Leu Asp Thr Glu Glu Pro Val Asp Ala Val Gly  
                     20                                25                                30  
 Gly Thr Gly Arg Glu Met Ser Trp Met Asp Pro Ala Arg Gly Arg Pro  
                     35                                40                                45  
 Phe Pro Trp Gly Ser Pro Gly Trp Pro Arg Ala Pro Tyr Pro His Ala  
                     50                                55                                60  
 Leu Leu Val Thr Ala Lys Glu Leu Arg Ala Ser Gly Lys Ala Arg Ala  
                     65                                70                                75                                80  
 Gly Phe Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gln Asp Asp Gly Ser Glu Ala Thr  
                     85                                90                                95  
 Gly Leu Leu Leu Gly Glu Ala Glu Lys Val Gly Gly Leu Leu Gly Thr  
                     100                                105                                110  
 Leu Ala Glu Glu Leu Asn Gly Tyr Ser Arg Lys Lys Gly Gly Phe Ser  
                     115                                120                                125  
 Phe Arg Phe Gly Arg Arg  
                     130

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 402

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 8

atgcgagagcc cttactccct gccctacctc ctgttcctgc ccctgggtgc ctgcttcccg 60  
 gtgctggaca cagaggagcc tgtggatgcc gtagggggca cggacgtga aatgagctgg 120

6/22

atggaccg cgaggggacg cccctttccg tggggctccc ctgggtggcc gagagccccg 180  
taccacacg ccctgctcgt cacggccaag gagctgcggg cgtcaggcaa ggcgcgtgct 240  
ggcttccagc tgcgtctcgg gaggcaggac gatggcagcg aggccactgg cctcctcctg 300  
ggggaggccg agaaggtggg gggcctgttg ggaaccctgg ctgaggagct caatggctac 360  
agcaggaaga aggggggctt cagcttccgc ttcggtcggc gg 402

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 431

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Pro Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Arg  
1 5 10 15  
Asp His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile Ala Leu Tyr Arg Leu Arg  
20 25 30  
Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Gly Arg Ala Lys Leu Ala Leu  
35 40 45  
Val Leu Thr Gly Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ala  
50 55 60  
Leu Val Phe Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr  
65 70 75 80  
Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Thr Phe  
85 90 95  
Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Asn Trp Leu  
100 105 110  
Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala  
115 120 125  
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His  
130 135 140

7/22

Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Asn Arg  
145 150 155 160  
Arg Ala Phe Thr Met Leu Gly Val Val Trp Leu Val Ala Val Ile Val  
165 170 175  
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Gln Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe  
180 185 190  
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Thr Ser Pro  
195 200 205  
Val His Gln Lys Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu  
210 215 220  
Leu Pro Leu Met Val Met Leu Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu  
225 230 235 240  
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Gly Ser Val Leu Arg Thr Ile  
245 250 255  
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val  
260 265 270  
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro  
275 280 285  
Phe His Val Val His Met Met Ile Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu  
290 295 300  
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Ile Phe Ala Ile Val Gln Ile Ile  
305 310 315 320  
Gly Phe Ser Asn Ser Ile Cys Asn Pro Ile Val Tyr Ala Phe Met Asn  
325 330 335  
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Val Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val  
340 345 350  
Asn Lys Thr Phe Ser Pro Ala Gln Arg His Gly Asn Ser Gly Ile Thr  
355 360 365

8/22

Met Met Arg Lys Lys Ala Lys Phe Ser Leu Arg Glu Asn Pro Val Glu

370

375

380

Glu Thr Lys Gly Glu Ala Phe Ser Asp Gly Asn Ile Glu Val Lys Leu

385

390

395

400

Cys Glu Gln Thr Glu Glu Lys Lys Lys Leu Lys Arg His Leu Ala Leu

405

410

415

Phe Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Ser Pro Leu Asp Ser Gly His

420

425

430

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1293

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 10

```

atgcaggcgc ttaacattac cccggagcag ttctctcggc tgctgcggga ccacaacctg   60
acgcggggagc agttcatcgc tctgtaccgg ctgcgaccgc tcgtctacac ccagagctg   120
ccgggacgcg ccaagctggc cctcgtgctc accggcgtgc tcatcttcgc cctggcgctc   180
tttggcaatg ctctggtggt ctacgtggtg accgcagca aggccatgcg caccgtcacc   240
aacatcttta tctgctcctt ggcgtcagt gacctgctca tcaccttctt ctgcattccc   300
gtcaccatgc tccagaacat ttccgacaac tggctggggg gtgctttcat ttgcaagatg   360
gtgccatttg tccagtctac cgctgttgtg acagaaatcc tcactatgac ctgcattgct   420
gtggaaaggc accagggact tgtgcatcct tttaaaatga agtggcaata caccaaccga   480
agggctttca caatgctagg tgtggtctgg ctggtggcag tcatcgtagg atcaccatg   540
tggcacgtgc aacaacttga gatcaaatat gacttcctat atgaaaagga acacatctgc   600
tgcttagaag agtggaccag ccctgtgcac cagaagatct acaccacctt catccttgct   660
atcctcttcc tcctgcctct tatggtgatg cttattctgt acagtaaaat tggttatgaa   720
ctttggataa agaaaagagt tggggatggt tcagtgcctc gaactattca tggaaaagaa   780
atgtccaaaa tagccaggaa gaagaaacga gctgtcatta tgatggtgac agtgggtggct   840
ctctttgctg tgtgtgggc accattccat gttgtccata tgatgattga atacagtaat   900

```

9/22

ttgaaaagg aatatgatga tgtcacaatc aagatgattt ttgctatcgt gcaaattatt 960  
 ggattttcca actccatctg taatcccatt gtctatgcat ttatgaatga aaacttcaaa 1020  
 aaaaatgttt tgtctgcagt ttgttattgc atagtaaata aaaccttctc tccagacaaa 1080  
 aggcatggaa attcaggaat tacaatgatg cggaagaaag caaagttttc cctcagagag 1140  
 aatccagtgg aggaaccaa aggagaagca ttcagtgatg gcaacattga agtcaaattg 1200  
 tgtgaacaga cagaggagaa gaaaaagctc aaacgacatc ttgctctctt taggtctgaa 1260  
 ctggctgaga attctccttt agacagtggg cat 1293

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 433

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 11

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser

5

10

15

Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg

20

25

30

Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Val Ala Phe

35

40

45

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser

50

55

60

Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr

65

70

75

80

Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe

85

90

95

Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu

100

105

110

Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala

115

120

125

10/22

Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His  
130 135 140  
Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg  
145 150 155 160  
Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val  
165 170 175  
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe  
180 185 190  
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro  
195 200 205  
Val His Gln Arg Ile Tyr Ser Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu  
210 215 220  
Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu  
225 230 235 240  
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile  
245 250 255  
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val  
260 265 270  
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro  
275 280 285  
Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu  
290 295 300  
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile  
305 310 315 320  
Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn  
325 330 335  
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Phe Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val  
340 345 350

11/22

Lys Glu Ser Ser Ser Pro Ala Arg Lys Pro Gly Asn Ser Gly Ile Ser

355

360

365

Met Met Gln Lys Arg Ala Lys Leu Ser Arg Pro Gln Arg Pro Val Glu

370

375

380

Glu Thr Lys Gly Asp Thr Phe Ser Asp Ala Ser Ile Asp Val Lys Leu

385

390

395

400

Cys Glu Gln Pro Arg Glu Lys Arg Gln Leu Lys Arg Gln Leu Ala Phe

405

410

415

Phe Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Ser Thr Phe Gly Ser Gly His Glu

420

425

430

Leu

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 12

atgcaggcgc tcaacatcac cgcggagcag ttctcccgcc tgctgagcgc gcacaacctg	60
actcggggagc agttcattca tcgctatggg ctgagaccgc tggctctacac tccggagctg	120
cccgcgcgtg ctaaagtggc ctttgcgctg gcaggagcac tcatttttgc cctggcgctc	180
ttcggcaact ctctgggtcat ctatgtgggtg acccgcagca aggccatgcg caccgtcacc	240
aacatcttca tctgctctct ggcaactcagt gatctgctca ttgccttctt ctgcatcccc	300
gtcacgatgc tccagaacat ctccgacaag tggctgggtg gtgccttcat ctgcaagatg	360
gtaccctttg tccagtccac ggccgtcgtg acagaaatcc tcaccatgac ctgcatcgct	420
gttgagaggc accaaggact tgtccatcct tttaaaatga agtggcagta caccacccga	480
agggccttca cgatcttggg cgtgggtctg ttggcggcca tcatcgtagg atcaccatg	540
tggcacgtgc aacgccttga gattaagtat gacttcctct atgaaaaaga acacatctgc	600
tgcttgaag aatgggccag ccccgtcac cagagaatct acagcacctt cattctcgtc	660
atcctcttcc tctgcctct tgttgtaatg ctagtctct atagcaagat tggctatgaa	720

12/22

ctgtggatca agaagagagt gggagacagt tcagcgcttc aaactatcca cgggaaagaa 780  
 atgtccaaaa tagccaggaa gaagaagcgg gctgtcatta tgatgggtgac tgtgggtggct 840  
 ctcttttctg catgctgggc acctttccac gttgttcaca tgatgggtga gtacagtaat 900  
 tttgaaaaag aatatgatga tgtcacaatc aagatgggtct ttgctgtcgc gcagacaatt 960  
 ggctttttca actccatctg taatcccttt gtgtatgcgt ttatgaatga aaacttcaaa 1020  
 aagaattttc tgtctgctgt ttgttattgc atagtgaaag aatcctcctc cccagcacgg 1080  
 aagcctggga attctggaat atcaatgatg cagaagagag caaagttatc tcgaccacag 1140  
 cgtccagtgg aagaaaccaa aggagacaca ttcagtgatg ccagcattga tgtcaaattg 1200  
 tgcgagcagc cgcgggagaa aagacaactc aagagacagc tagccttctt cagttctgaa 1260  
 ctttctgaaa actctacttt tggtagtggc catgaactg 1299

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 436

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 13

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Ala Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Ser

5

10

15

Ala His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile His Arg Tyr Gly Leu Arg

20

25

30

Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Ala Arg Ala Lys Leu Ala Phe

35

40

45

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ser

50

55

60

Leu Val Ile Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr

65

70

75

80

Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Ala Phe

85

90

95

Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Lys Trp Leu



13/22

100	105	110	
Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala			
115	120	125	
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His			
130	135	140	
Gln Gly Leu Ile His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Thr Arg			
145	150	155	160
Arg Ala Phe Thr Ile Leu Gly Val Val Trp Leu Ala Ala Ile Ile Val			
165	170	175	
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Arg Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe			
180	185	190	
Leu Tyr Glu Lys Glu His Val Cys Cys Leu Glu Glu Trp Ala Ser Pro			
195	200	205	
Met His Gln Arg Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu			
210	215	220	
Leu Pro Leu Val Val Met Leu Val Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu			
225	230	235	240
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Ser Ser Ala Leu Gln Thr Ile			
245	250	255	
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val			
260	265	270	
Val Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Ala Cys Trp Ala Pro			
275	280	285	
Phe His Val Val His Met Met Val Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu			
290	295	300	
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Val Phe Ala Val Ala Gln Thr Ile			
305	310	315	320
Gly Phe Phe Asn Ser Ile Cys Asn Pro Phe Val Tyr Ala Phe Met Asn			

[illegible]

<400> 14

atgcaggcgc	tcaacatcac	cgcgagcag	ttttcccggc	tgctgagcgc	gcacaacctg	60
actcggaac	agttcattca	tcgctatggg	ctgcgaccgc	tggtctacac	tccggagctg	120
cccgcgcgcg	ctaaactggc	ctttgcgctg	gctggagcac	tcatttttgc	cctggcgctc	180
tttgcaact	ctctggtcat	ctatgtggtg	acccgcagca	aggccatgcg	caccgtcacc	240
aacatcttca	tctgctctct	ggcactcagt	gatctgctca	ttgccttctt	ctgcatcccc	300
gtcacgatgc	tccagaacat	ctccgacaag	tggctgggtg	gtgccttcac	ctgcaagatg	360
gtgcccttcg	tccagtccac	tgctgtttgt	acggaaatcc	tcaccatgac	ttgcatcgct	420
gttgagaggc	accaaggact	catccatcct	tttaaaatga	agtggcagta	cactacccca	480

agggttttca caatcttggg tgtggtctgg ttggcagcca tcatcgtagg atcacccatg 540  
tggcacgtac aacgcctcga gattaagtat gacttcctct atgagaaaga acatgtctgc 600  
tgtttggaag agtggggccag ccccatgcac cagagaatct acaccacctt catcctcgtc 660  
atctctttcc tctgccgct tgtggtgatg ctgtcctct acagcaagat tggctatgaa 720  
ctgtggatca agaagagagt tggagacagt tcagcacttc agactatcca cgggaaagaa 780  
atgtccaaaa tagccaggaa gaagaagcgg gctgtcgtta tgatggtgac agtgggtggct 840  
ctcttcgctg cgtgctgggc acctttccat gttgttcaca tgatggttga gtacagtaac 900  
tttgaaaaag agtatgatga tgtcacaatc aagatgggtt ttgctgttgc acaaacaatt 960  
ggctttttca actccatctg taatcccttt gtgtatgcat ttatgaatga aaacttcaaa 1020  
aagaatTTTT tgtctgcggt ttgttattgc atagtaagag aaaccttctc cccaggacag 1080  
aagcctggaa attctgggat ttcaatgatg caaaagagag caaagttatc acgatcacag 1140  
cgtccagtgg cggaagccaa aggagactta ttcagcgatg ccaacgttga tgtcaaattg 1200  
tgtgagcagc caggggagaa aaggcaactc aagcgacagc ttgccttctt tagttctgaa 1260  
ctttctgaaa actctacttt cggcagtgga catgaactgt aatatoga 1308

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

atggtaaggc cttacccccct gatctac

27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

16/22

&lt;400&gt; 16

caaatccttc caaggcgtcc tggccct

27

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 17

cctcctctct ctcctcctc tgctcag

27

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 18

acggggcaga gtccacgcag gccctca

27

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 19

atgaggggct tccggccttt gctttcc

27

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

tcaccgtcca aagcggaagc tgaagcc

27

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

atgcggagcc cttactccct gcctac

27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

tcaccgccga ccgaagcgga agctgaa

27

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

cgtcgacgca tgcaggcgct caacatcacc gcg 33

<210> 24

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

cactagttta cagttcatgg ccactaccaa aagta 35

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

cgtcgacgca tgcaggcgct caacatcacc gcg 33

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

catcgatatt acagttcatg tccactgccg aaagta 36

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

ccagaacatt tccgacaact g

21

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

acagcggtag actggacaaa

20

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 29

tgctttcatt tgcaagatgg tgcc

24

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

cggaagcctg ggaattctg

19

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

atgtgtctcc ttggtttct tcca

24

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 32

agcaaagtta tctcgaccac agcgtcca

28

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

agcacactgg cttccgtcta g

21

<210> 34

<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

cgctggcctt ctctgagtca

20

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 35

aggcaggaca gtggcagtga agcc

24

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

tgagagcttc acagccaca

19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

agctgaagcc gcctttctt

19

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 38

aacctggctg aggagctcaa tggcta

26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11160

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P1/00, 3/00, 5/38,  
25/00, 29/00, 35/00, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00-39/44, 45/00-45/08, 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),  
CAplus (STN), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/11015 A1 (ALPHAGENE, INC.), 02 March, 2000 (02.03.00), & AU 9957847 A & EP 1107978 A1 & JP 2002-537757 A	1-61, 64-69
A	WO 00/22131 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 20 April, 2000 (20.04.00), & AU 9962991 A & EP 1137776 A2 & KR 2001080882 A & KR 2001086040 A & CN 1344319 A & MX 2001003726 A1 & MX 2001005021 A1 & US 2003/0018182 A1 & JP 2003-525018 A	1-61, 64-69
A	WO 00/31258 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.), 02 June, 2000 (02.06.00), & AU 200037904 A & EP 1133559 A2 & CN 1344319 A	1-61, 64-69

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 November, 2003 (07.11.03)

Date of mailing of the international search report  
25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11160

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/78809 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 28 December, 2000 (28.12.00), & EP 1189944 A1	1-61, 64-69
A	EP 1207201 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 22 May, 2002 (22.05.02), & WO 01/16316 A1 & JP 2001-136981 A & AU 200067279 A	1-61, 64-69
A	WO 01/48189 A1 (Helix Research Institute), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200122304 A	1-61, 64-69
A	WO 02/42458 A2 (TULARIK INC.), 30 May, 2002 (30.05.02), & AU 200239291 A & US 2003/0027252 A1	1-61, 64-69
A	WO 02/04518 A2 (BAYER CORP.), 17 January, 2002 (17.01.02), & US 2002/0048791 A1 & AU 200171838 A	1-61, 64-69

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11160

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 62, 63

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 62, 63 are relevant to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/17, 39/395, 45/00, 48/00, A61P1/00, 3/00,  
5/38, 25/00, 29/00, 35/00, G01N33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/00-39/44, 45/00-45/08, 48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq BIOSIS (STN) MEDLINE (STN)  
EMBASE (STN) CAPLUS (STN) WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/11015 A1 (ALPHAGENE, INC.) 2000.03.02 & AU 9957847 A & EP 1107978 A1 & JP 2002-537757 A	1-61, 64-69
A	WO 00/22131 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 2000.04.20 & AU 9962991 A & EP 1137776 A2 & KR 2001080882 A & KR 2001086040 A & CN 1344319 A & MX 2001003726 A1 & MX 2001005021 A1 & US 2003/0018182 A1 & JP 2003-525018 A	1-61, 64-69

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.11.03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4P

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/31258 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 2000.06.02 & AU 200037904 A & EP 1133559 A2 & CN 1344319 A	1-61, 64-69
A	WO 00/78809 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2000.12.28 & EP 1189944 A1	1-61, 64-69
A	EP 1207201 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2002.05.22 & WO 01/16316 A1 & JP 2001-136981 A & AU 200067279 A	1-61, 64-69
A	WO 01/48189 A1 (株式会社ヘリックス研究所) 2001.07.05 & AU 200122304 A	1-61, 64-69
A	WO 02/42458 A2 (TULARIK INC.) 2002.05.30 & AU 200239291 A & US 2003/0027252 A1	1-61, 64-69
A	WO 02/04518 A2 (BAYER CORPORATION) 2002.01.17 & US 2002/0048791 A1 & AU 200171838 A	1-61, 64-69

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 62, 63 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲62, 63に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。